

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 337**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2004 E 09170230 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 2157192**

54 Título: **Composiciones para diagnosis y terapia de enfermedades asociadas con la expresión aberrante de futrinas (R-Espondinas)**

30 Prioridad:

10.10.2003 EP 03023000

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.01.2014

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
(100.0%)
IM NEUENHEIMER FELD 280
69120 HEIDELBERG, DE**

72 Inventor/es:

**NIEHRS, CHRISTOF;
GLINKA, ANDREI;
KAZANSKAYA, OLGA y
WU, WEI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 437 337 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones para diagnóstico y terapia de enfermedades asociadas con la expresión aberrante de futrinas (R-Espondinas)

- 5 La presente invención se refiere a composiciones útiles para la terapia de enfermedades asociadas con la expresión aberrante de los genes que codifican las proteínas Futrina 2 (=R-Espondina 3). Estas enfermedades incluyen tumores de v.g. mama, ovario, hígado, útero, cérvix, colon, pulmón, ovario, recto, testículo, páncreas, huesos y piel, así como enfermedades que implican músculo, hueso, metabolismo de lípidos y glucosa, y obesidad. La presente invención se refiere también a un método para identificar activadores/agonistas o inhibidores/antagonistas de Futrina 2.
- 10 La cascada de señales Wnr juega un papel crucial en lo que respecta a la regulación de la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células durante la embriogénesis, y el adulto como se muestra, v.g., en *Drosophila*, *Xenopus* y ratones (Nusse y Varmus, Cell 69 (1992), 1073-1087). Los genes Wnt codifican glicoproteínas secretoras que activan una cascada de señales bien caracterizada por la vía de un receptor Wnt denominado "frizzled" (ensortijado).
- 15 La cascada de señalización Wnt y sus componentes juegan también un papel importante en diversas enfermedades, lo que hace deseable modular su actividad:
- i) Cáncer
- 20 La tumorigénesis representa un proceso multietápico complejo en el cual se cree que cambios genéticos y factores ambientales desregulan los procesos celulares que controlan la proliferación y diferenciación de las células. Varios estudios indican que una cascada de señales Wnt aberrante está implicada en el desarrollo de cáncer de colon, cáncer de mama y melanoma (Pfeifer, Science, 275 (1997), 1752-1753; Polakis, Genes Dev. 14 (2000), 1837-1851). El primer gen codificante de una proteína de la cascada de señales Wnt, *int-1*, fue aislado del virus del tumor mamario del ratón (MMTV) y pudo demostrarse que se trata de un oncogén. Por consiguiente, está bien establecido que una regulación aberrante de la actividad Wnt y/o componentes de la cascada de señales Wnt aguas abajo de la señal Wnt, v.g., beta-catenina y APC, están implicadas en la tumorigénesis.
- 25
- ii) Enfermedad ósea
- 30 Las señales Wnt promueven la formación de hueso (v.g. Yang, Development, 130 (2003), 1003-15; Fischer, J. Biol. Chem. 277 (2002) 30870-30878). Coherentemente con esta idea, una mutación de aumento de función del receptor Wnt LRP5 causa enfermedad grave de los huesos (Boydén, et al., 346 (2002) N Engl J Med, 1513-21.; Little, et al, 70 (2002) Am J Hum Genet, 11-9.). Inversamente, la desactivación de las mutaciones en LRP5 conduce a un síndrome de osteoporosis-pseudoglioma en humanos (Kato, et al., 157 (2002) J Cell Biol, 303-14.; Gong, et al., 107 (2001) Cell, 513-23.).
- iii) Enfermedad oftálmica
- 35 La desactivación de la mutación en el receptor Wnt LRP5 conduce a pseudoglioma en humanos y malformaciones de los ojos en los ratones (Kato, et al, 157 (2002) J Cell Biol 303-314; Gong, et al, 107 (2001) Cell, 513-523).
- iv) Riñón
- 40 La señalización aberrante Wnt está implicada en la fibrosis renal (Surendran, Am J Physiol Renal Physiol 282 (2002) 431-441) y la enfermedad de riñón poliquístico (Saadi-Kheddouci, Oncogene 20 (2001) 5972-5981).
- v) Metabolismo de lípidos y glucosa, obesidad
- 45 La deficiencia del receptor Wnt LRP5 en los ratones conduce a niveles incrementados de colesterol en plasma en ratones alimentados con una dieta rica en grasa, debido al aclaramiento hepático reducido de los residuos de quilomicrones. Adicionalmente, cuando se alimentan con una dieta normal, los ratones deficientes en LRP5 exhiben una tolerancia notablemente empeorada a la glucosa (Fujino, et al., 100 (2003) Proc Natl. Acad. Sci. USA, 229-234). La administración del antagonista de LRP5 Dkk1 a los ratones reduce la absorción de glucosa en diversas líneas de células y disminuye la deposición de grasa (WO 02/066509).
- 50 Está claro por consiguiente, partiendo de lo anterior, que el camino de señalización Wnt está implicado en una diversidad de enfermedades humanas. Sin embargo, están insuficientemente disponibles medios para la terapia o diagnóstico de las enfermedades asociadas con una cascada de señales Wnt desregulada. Por ello, el uso de marcadores moleculares fiables de diagnóstico sería útil para una comprensión de la base molecular de las enfermedades asociadas con una cascada de señales Wnt aberrante. Puede esperarse que tales marcadores sean

también útiles para terapia y para el desarrollo de nuevas vías terapéuticas para tratamiento de las enfermedades dependientes de la cascada de señales Wnt, como se ha detallado arriba.

Así pues, el problema técnico que subyace en la presente invención es proporcionar medios para la terapia de enfermedades asociadas con una cascada de señalización Wnt aberrante.

- 5 La solución a dicho problema técnico se obtiene por la provisión de las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

10 Durante los experimentos que condujeron a la presente invención, pudo identificarse el gen 2, cuyo producto es un modulador del camino Wnt. Futrina 2 se identificó previamente como HPWTSR (Chen et al., 29 (2002), Mol. Biol. Rep. 287-292), una proteína de papel o función anteriormente desconocido, expresada en numerosos tipos de células. Adicionalmente, las Futrinas humanas 1, 2, 3 y 4 fueron descritas como Polipéptidos Semejantes a Factores del Crecimiento de las Células Madre, que son capaces de promover la proliferación de células madre hematopoyéticas (WO-A-01/77169; WO-A-01/07611).

15 En lo que sigue se demuestra por primera vez: 1) las Futrinas intensifican la señalización Wnt y esto tiene relevancia fisiológica, dado que la inhibición de Futrina 1 ó 2 da como resultado la inhibición de la cascada de señales Wnt (señalización Wnt/ β -catenina). Estos datos demuestran que las Futrinas pueden considerarse como moduladores Wnt. La Futrina 1 (Rspo2) es co-expresada con y regulada positivamente por las señales Wnt y tiene efectos sinérgicos con Wnt para activar β -catenina. El análisis de la interacción funcional con los componentes del camino Wnt/ β -catenina sugiere que Rspo2 funciona extracelularmente al nivel de la interacción receptor-ligando. Experimentos con morfolino antisentido en embriones de *Xenopus* y experimentos de RNAi en células HeLa
20 revelaron que Rspo2 es necesaria para la señalización Wnt/ β -catenina. En embriones de *Xenopus* empobrecidos en Rspo2, los marcadores musculares myoD y myf5 no pueden activarse y el desarrollo muscular posterior resulta deteriorado. Los resultados indican que Rspo2 es un nuevo activador de la cascada Wnt/ β -catenina. Así, Futrinas tales como Rspo2 (Futrina 1) son útiles para la diagnosis y el desarrollo de terapias para enfermedades mediadas por Wnt-LRP, con inclusión de la supresión de tumores, formación de hueso, metabolismo de colesterol y glucosa (incluida diabetes), obesidad, enfermedad renal y enfermedad oftálmica. 2.) Dado que los datos obtenidos demuestran que se requiere Futrina 1 para la formación de músculo, Futrina 1 es útil para la diagnosis y el desarrollo de terapias para enfermedades relacionadas con los músculos, con inclusión de la regeneración muscular. 3.) Los datos demuestran que las Futrinas se expresan aberrantemente en una diversidad de tumores humanos. Así pues, las Futrinas son útiles para la diagnosis de tumores y el desarrollo de terapias del cáncer. Por ejemplo, se ha
25 encontrado que en la mayoría de los tumores, la expresión de Futrinas 1-3 está reducida drásticamente (tumores de colon, estómago, pulmón, recto para Futrina 1, tumores de mama, ovario, vejiga, útero, cérvix, recto para Futrina 2, tumores de útero y cérvix para Futrina 3). En un pequeño número de casos, la expresión de Futrinas 1-3 está regulada en sentido creciente (un caso de tumor de estómago para Futrinas 1 y 2, tumor de ovario para Futrina 3). Futrina 4 exhibe un nivel muy bajo de expresión en la mayoría de los tejidos estudiados, excepto en el ovario.

35 Así pues, la inhibición de la cascada de señales Wnt por inhibición de la expresión/actividad de las Futrinas o por estimulación de la expresión/actividad de las Futrinas tendrá un efecto terapéutico. Análogamente, la activación de la cascada de señales Wnt por disminución de la expresión de Futrina y/o por represión de la actividad del polipéptido propiamente dicho tendrá un efecto terapéutico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

40 Figura 1: Identificación de Futrina 1 (Rspo2) de *Xenopus*

El informador TOP-FLASH, el DNA vector de agrupaciones de 250 clones cada una y pCSfrizzled8 se co-transfectaron. Se llevaron a cabo ensayos de informadores luciferasa en células 293T en placas de 96 pocillos por duplicado como se ha descrito (Wu et al., Curr Biol 10 (2000), 1611-1614). La actividad de luciferasa se normalizó
45 contra la actividad de Renilla-luc co-transfectada utilizando un kit comercial (Clontech). RLU: unidades relativas de luciferasa.

Figura 2: Futrina 1 (Rspo2) promueve la señalización Wnt/ β -catenina

- (A) Identificación de Rspo2 de *Xenopus* por cribado de la expresión. Se llevó a cabo un cribado de la expresión en células 293T transfectadas con un informador sensible a Wnt (TOPFLASH) y agrupaciones de DNA plasmídico de un banco de cDNA de ojos de *Xenopus*. RLU: unidades relativas de luz.
- 50 (B) El extremo C de Rspo2 media en la retención en la superficie celular. Se transfectaron Rspo2 marcada con Myc (wt) o Rspo2 Δ C (Δ C) en células 293T, y se analizaron el lisado de células y el medio por transferencia Western. Co, células no transfectadas.
- (C) Rspo2 activa la señalización Wnt/ β -catenina. Se llevaron a cabo ensayos del informador TOPFLASH de luciferasa en células 293T con los DNAs transfectados siguientes: Wntl de ratón (Wnt), 5 ng; frizzled8 (fz) de ratón, 1 ng; Rspo2 de *Xenopus* (Rspo2), 0,1, 0,3, 0,9 y 2,7 ng.
- 55

(D) Rspo2 intensifica la señalización Wnt3a. Se añadieron Wnt3a de ratón, Rspo2ΔC de *Xenopus* (Rspo2ΔC) o medios falsamente acondicionados a células 293T, seguido por ensayos informadores luciferasa TOPFLASH.

5 (E) Rspo2 estabiliza la β-catenina. (arriba) Se trataron células 293T con Rspo2ΔC, Wnt3a o medios falsamente acondicionados durante 1 ó 4 horas como se indica. Se sometieron fracciones de citosol a transferencia Western y se sondaron respecto a β-catenina y α-tubulina (control de carga), (abajo) Tinción inmunohistoquímica de β-catenina en células SHEP después de 3 horas de tratamiento con los medios acondicionados indicados. Las puntas de flecha indican β-catenina nuclear. El porcentaje de células que exhibían la tinción representada es 90% (Co), 85% (Rspo2), 80% (Wnt3a) y 90% (Wnt3a+Rspo2).

10 (F) Análisis de dominios de Rspo2. (arriba) Dibujo esquemático de Rspo2 de *Xenopus* y constructos de delección. sp, péptido señal; FU1, 2, dominios semejantes a furina; TSP1, dominio de trombospondina tipo 1; C, término C cargado positivamente, (abajo) Se llevaron a cabo ensayos con el informador luciferasa TOPFLASH en células 293T con los constructos indicados. Se confirmó una producción igual de proteínas por transferencia Western (datos no presentados).

15 Figura 3: Alineación de ácido nucleico multisequencia de cDNAs codificantes de Futrinas humanas 1, 2, 3 y 4 y Futrina 1 de Xenopus

Los nucleótidos idénticos se resaltan en negro. Todas las secuencias de ácido nucleico comienzan con el codón ATG iniciador de la traducción indicado con un asterisco.

20 Figura 4: Alineación multisequencia de aminoácidos de Futrinas humanas 1, 2, 3 y 4 deducida de los cDNAs humanos (véase la Figura 3)

Los aminoácidos idénticos se resaltan en negro, los aminoácidos similares se muestran en gris.

Figura 5: Las Futrinas promueven la señalización Wnt

25 Experimentos de cotransfección en células 293T. Se llevaron a cabo ensayos con el informador luciferasa sensible a Wnt en placas de 96 pocillos por triplicado como se ha descrito (Wu et al., Curr Biol 10 (2000), 1611-1614). La actividad de luciferasa se normalizó contra la actividad de Renilla utilizando un kit comercial (Clontech). Wnt1 = Wnt1 de ratón, fz8 = frizzled8 de ratón, Futrina1 = Futrina1 de *Xenopus*, Wnt3A = Wnt3A de ratón, (0,1 ng) en A indica la cantidad de DNA plasmídico transfectada por pocillo, RLU = unidades relativas de luciferasa.

Figura 6: Comparación de secuencias de las proteínas Rspo humanas (hR-espondina 1 a 4)

30 (A) Alineación de proteínas Rspo humanas (h) (correspondiente a las alineaciones de Fut1-4 humana en la Figura 4, excepto que se utilizan designaciones diferentes). El péptido señal, los dominios semejantes a furina y el dominio de trombospondina tipo 1 están subrayados y los aminoácidos conservados se muestran en negro. (B, C) Matriz de homología de Rspo que muestra una vista de conjunto de la identidad de aminoácidos en % entre las proteínas Rspo humanas (B) y entre las proteínas Rspo2 de *Xenopus* (X) o ratón (m) y proteínas Rspo humanas, respectivamente (C).

35 Figura 7: Futrinas humanas 1 y 2 son necesarias para la señalización Wnt

Se transfectaron células HeLa en placas de 24 pocillos con el informador Wnt 7LEF-Rev-fosLuc y los plásmidos pRL-TK y pSuper que producen o bien siRNA contra Futrinas 1 y 2 humanas o un control sin sentido. Tres días después de la transfección, se añadió medio acondicionado Wnt3A de ratón al cultivo para estimular la señalización Wnt. 24 horas más tarde, se determinó la actividad de luciferasa.

40 Figura 8: Análisis de la expresión de R-espondinas de Xenopus y ratón

(A) Expresión de Rspo2 durante el desarrollo de *Xenopus* en las etapas embrionarias que se indican, analizada por RT-PCR. Se utilizó para normalización histona H4. -RT, control de transcripción inversa negativa.

45 (B-H) Hibridaciones in situ del montaje entero en *Xenopus* de los genes indicados. (B) Embriones en etapa 11, vista dorso-vegetal; dbl, labio blastoporal dorsal. (C) Embrión de etapa 12, vista dorsal con la parte anterior hacia arriba. Un dominio de expresión neural se indica por una punta de flecha. (D) Embrión de la etapa 15, vista dorsal con la parte anterior hacia arriba. (E) Embrión de la etapa 14, vista dorsal con la parte anterior hacia arriba. (F-G) Embriones de la etapa del primordio de la cola; ba, arcos branquiales; cm, musculatura craneal; di, diencefalo; dnt, tubo neural dorsal; mhb, límite cerebro medio-cerebro posterior; ov, vesícula auricular; pn, pronefros; pdm, proctodeum; s, somitos; tb, mesodermo del primordio de la cola. El recuadro en (F) muestra una sección transversal al nivel indicado por la punta de flecha, mostrando la expresión en el tubo neural dorsal y en las partes extremas dorsales y ventrales de los somitos. (H) Cerebro del renacuajo de *Xenopus* disecado (vista lateral) que muestra la expresión en diencefalos (di) y zona limitante intratálamica (zli), donde se expresa el *erizo sónico* (recuadro), dt, vt, tálamo dorsal y ventral, respectivamente, se, médula espinal; tel, telencéfalo.

50

(I-M) Hibridaciones in situ del montaje entero en el ratón de los genes indicados. (I) Primordios de los miembros de embriones de ratón de 12,5 días. AER, reborde ectodérmico apical. (J) Embrión de ratón de 7,5 días que muestra la expresión de *Rspo3* en la línea primitiva. (K-M) Embriones de ratón de 9,5 días, di, diencéfalo; dnt, tubo neural dorsal; met (sic), metencéfalo; tel, telencéfalo.

5 Figura 9: Regulación de las R-espondinas de *Xenopus* por señalización Wnt

(A) Comparación del patrón de expresión de *XRspo2*, *XWnt8* y *XWnt3a* en embriones tempranos de neurula por hibridación in situ del montaje entero. Vista dorsal, parte anterior hacia arriba.

10 (B) (arriba) Diagrama del experimento. Se inyectaron embriones de la etapa de cuatro células con 50 pg de pCS-ppl (preprolactina), pCS*XWnt8* o pCS- β -*catenina* en cada blastómero, se disecaron las DMZs, se cultivaron hasta el equivalente de la etapa 11 y se analizaron por RT-PCR. (abajo) Análisis RT-PCR de los genes indicados. -RT = control de transcripción inversa negativo.

(C-E) Se inyectaron embriones de la etapa de cuatro células con 50 pg de pCS-*Wnt8*, pCS-*Wnt3a* o pCS-*pp1* en un solo blastómero y se fijaron en la etapa 11 para hibridación in situ con *XRspo2*.

Figura 10: Se requiere Futrina2 para la formación de músculo

15 A.El empobrecimiento en Furrina 1 causa regulación decreciente de los marcadores musculares precoces y defectos musculares. (A, C, E, G, I, K) Embriones inyectados con oligomorfolino de control (5 ng), con Fut1-Mo (5 ng). Los oligos se mezclaron con el mRNA trazador de linaje (LacZ) (mancha azul) en (C, D, E, F, G, H) o RNA de preprolactina (ppl), visualizado por hibridación in situ (mancha roja) (A, B, J, K, L). La hibridación in situ con sondas a *Xmyf5* (A, B), *XmyoD* (C, D), *Xbra* (E, F), *Xnot* (G, H) y actina muscular (I-L) (tinción magenta). Los embriones en K y L están cortados transversalmente. Obsérvese la reducción de músculo en (L) (lado derecho).

20 B.Fut1-Mo actúan específicamente para inhibir la traducción de sus constructos de DNA cognados cuando se sobreexpresan en embriones. Se inyectó mRNA (*fut1* marcado con mycC-terminal) ecuatorialmente en ambos blastómeros en embriones de la etapa de 2 células. Los mismos embriones se inyectaron luego en la etapa de 8 células con 5 ng de Fut1-Mo (pista 3) o morfolino de control (pista 2) en todos los blastómeros vegetales y se recogieron en la etapa 11. La proteína Furrina 1 marcada se visualizó luego con un anticuerpo a-myc.

25 C.Rescate de la reducción del marcador muscular causada por Fut1-Mo por co-inyección de mRNA de XFut1 que contenía mutaciones puntuales en la región 5' correspondiente a oligomorfolino. Se co-inyectaron los embriones con 5 ng de Fut1-Mo (1, 2) con 50 pg de ppl o mRNA de XFut1 radialmente en un solo blastómero en la etapa de 4 células.

30 Se analizó la expresión de *MyoD* (1, 3) y *Myf5* (2,4) por hibridación in situ. Todos los embriones se agruparon en tres clases (ejemplos para *MyoD* se muestran en la parte inferior de la figura: embriones con nivel de expresión en el lado inyectado de 1-30% (clase A); 30-70% (clase B); y 70-100% (clase C) del nivel normal. Las barras representan el porcentaje de los embriones correspondiente al tipo A, B o C. (n para Fut-Mo+ppl: 57 embriones para *MyoD*, 45 embriones para *Myf5*; n para Fut-Mo+mRNA *Ffut1*: 39 embriones para *MyoD* y 41 embriones para *Myf5*).

Figura 11: *Rspo2* promueve diferenciación neural y muscular en *Xenopus*

40 (A) Se inyectaron físicamente a embriones en la etapa de 4 células 100 pg de *Rspo2*, 100 pg de *Xwnt8* o 200 pg de mRNA de β -*catenina* en cada blastómero. En la etapa 8, el casquillo animal se disecó, se cultivó hasta la etapa equivalente 18 y se analizó respecto a la expresión de los genes marcadores indicados, -RT, control de transcripción inversa negativo.

(B) Se inyectaron embriones de la etapa de dos células con 100 pg de *Rspo2* o mRNA de *preprolactina* (*ppl*) en cada blastómero. Obsérvese las glándulas de cemento ectópicas (punta de flecha) y el eje corporal acortado en el embrión inyectado con *Rspo2*.

45 (C-J) Hibridaciones in situ del montaje entero de los genes indicados. Embriones en la etapa de ocho células con 100 pg de mRNAs de *Rspo2* o *ppl* como se indica en un blastómero animal. Se co-inyectó mRNA de *lacZ* como trazador de linaje en todos los paneles excepto C, G y H.

(C-H) Néurulas de la etapa 15 en vista anterior.

(I-J) Gástrulas de la etapa 11 en vista vegetal con la parte dorsal hacia arriba.

50 (K-N) *Rspo2* promueve la formación de músculo. (K) Diagrama de los experimentos. Se inyectaron embriones de la etapa de cuatro células con 50 pg de constructos de DNA plasmídico en todos los blastómeros, se explantaron los fragmentos indicados en la etapa 10,5, se cultivaron, y se procesaron por hibridación in situ del montaje entero (M) de RT-PCR (N).

(L) VMZ equivalente de la etapa 40 de explantes LMZ. Obsérvense las estructuras semejantes a cola en VMZs de los embriones inyectados con *Rspo2*.

(M) Hibridación in situ de VMZs de la etapa 25 para actina muscular.

5 (N) Análisis RT-PCR para los genes indicados en los explantes VMZ equivalentes de la etapa 25 y DMZ equivalentes de la etapa 11. Xdd 1, dominante negativo. *Xenopus dishevelled*; Co, preprolactina.

Figura 12: *Rspo2* interfiere con BMP-4, Activina y Nodal, pero no con FGF en *Xenopus*

10 (A-D) Se inyectaron físicamente embriones en la etapa de cuatro células con los RNAs indicados. En la etapa 8, se disecó el casquillo animal, se cultivó hasta el equivalente a la etapa 10 y se analizó respecto a la expresión de *Vent2* (A) o *Xbra* (B-D). -RT, control de transcripción inversa negativo. Como control se utilizaron embriones inyectados con 100 pg de *preprolactina* (*ppl*). Cantidades de mRNAs utilizadas: 100 pg de *Rspo2*, 50 pg o 250 pg de *BMP-4*, 50 pg de *activina*, 25 ó 100 pg de *Wnt8*, 200 pg de β -catenina, 50 ó 100 pg de *Xnrl*, 2 ó 20 pg de *FGF8*.

Figura 13: Se requiere *Rspo2* de *Xenopus* para la formación de músculo

15 (A) *Rspo2*Mo inhibe específicamente la traducción de su DNA cognado. Arriba, Diagrama del experimento. Se inyectaron embriones de *Xenopus* de la etapa de dos células con 100 pg de mRNA de *Rspo2* marcado con Myc en la región animal, en la etapa de 8 células, se inyectaron luego los mismos embriones con 5 ng de *Rspo2*Mo de CoMo en todos los blastómeros de los animales, se cosecharon en la etapa 11 y se procesaron respecto a análisis por transferencia Western de *Rspo2* marcado con Myc y α -tubulina.

20 (B) El empobrecimiento en la proteína *Rspo2* causa defectos musculares y regulación decreciente de los marcadores miogénicos. Se inyectaron embriones en la etapa de cuatro células en posición ecuatorial en un solo blastómero con 5 ng de oligonucleótidos morfolino de control (CoMo) o *Rspo2*Mo como se indica junto con 50 pg de mRNA de *ppl* o 50 pg de RNA *LacZ* como trazador de linaje y se analizaron en la etapa gastrular del primordio de la cola por hibridación in situ para los genes indicados. En (a-f) se utilizó hibridación doble in situ para el gen de interés (azul oscuro) y para *ppl* (rojo), (a-d) Embriones de la etapa 25.

25 (a-b): miotomos, visualizados por expresión de actina muscular muestran malformaciones en el lado inyectado con *Rspo2*Mo (b). (c-d) Sección transversal a nivel del tronco que muestra volumen muscular reducido en (d). (e-h): expresión de *myf5* y *myoD* (azul oscuro) está regulada en sentido decreciente en la región inyectada con *Rspo2*Mo (rojo en e,f o azul claro en g,h). (i-l): la expresión de *Xbra* y *Xnot2* (azul oscuro) no se ve afectada en la región de las inyecciones de *Rspo2*Mo (azul claro).

30 (C) *Rspo2*Mo actúa específicamente. Rescate de la reducción de *myf5* por mRNA de *Rspo2* co-inyectado. Se inyectaron embriones en la etapa de cuatro células en un solo blastómero con 5 ng de morfolino de control (CoMo), *Rspo2*Mo, 50 pg de mRNA de *ppl* de 50 pg de mRNA de *Rspo2* que contenía desapareamientos respecto a *Rspo2*Mo. La expresión de *myf5* se analizó por hibridación in situ en la etapa gastrular. Se indica el porcentaje de embriones con expresión fuertemente afectada (A), moderadamente reducida (B) y normal de *myf5* (C) como se exhibía en los embriones representativos. Se calculó la desviación estándar a partir de tres experimentos independientes.

35 (D) *Rspo2*Mo bloquea la señalización Wnt aguas arriba de *dishevelled* durante la formación de músculo. Se inyectaron radialmente embriones en la etapa de cuatro células con 5 ng de *Rspo2*Mo o CoMo, 50 pg de *pCS-XWnt8*, *pCS-dishevelled* (*Xdsh*), GSK-3 β *pCS*-dominante negativo (*dnGSK*) o *pCS- β -catenina*. En la etapa 10,5, se explantaron DMZs (a) o VMZs (b) o LMZs (c-d) y se cultivaron hasta la etapa 11 (a, c) o 25 (b, d) para análisis RT-PCR de los genes indicados. -RT: control de transcripción inversa negativo.

Figura 14: Se requieren *R-espondinas* para la señalización Wnt en células HeLa

45 (A) Análisis RT-PCR que muestra la expresión diferencial de *Rspo1-4* humanas en líneas de células HeLa y 293T. Se utilizó actina para normalización.

(B) Especificidad de siRNAs. Se cotransfectaron células 293T con pSUPER-*Rspo2* ó-3 (siRNA), *Rspo3* marcada con FLAG y GFP (control de transfección). La expresión de *Rspo3* y GFP se analizó por transferencia Western.

50 (C-D) Se requieren *R-espondinas* para señalización Wnt/ β -catenina en células HeLa. Ensayo del informador luciferasa Wnt en células HeLa cotransfectadas con los constructos indicados. Se añadió Wnt3a como medio acondicionado. RLU, unidades relativas de luz.

Figura 15: La expresión de futrina está desregulada en diversos tumores humanos

La expresión de Futrina 1, 2, 3 y 4 o ubiquitina (para mostrar carga igual) se analizó por hibridación radiactiva en

mRNAs desplegados (Clontech, Cancer Profiling Array II) de muestras de tejido normal y canceroso de diferentes pacientes. Abreviaturas: N, tejidos normales; T, tejidos tumorales.

Figura 16: Expresión de R-espondinas humanas en muestras tumorales

5 Análisis por transferencia de mancha de *Rspo* 1, 2 y 3 humanas en muestras normales y tumorales. Las mismas muestras de cDNA (Cancer Profiling Array II, Clontech) se hibridaron con *Rspo*1, 2, 3 y humanas y sondas de ubiquitina. (arriba) La Cancer Profiling Array contiene pares de cDNAs de muestras tumorales y de tejidos normales correspondientes de pacientes individuales y aplicadas paralelamente como se indica. Las abreviaturas de los órganos son: br, mama; ov, ovario; co, colon; st, estómago; lu, pulmones; riñon; bi, vejiga; vu, vulva; pr, próstata; tr, tráquea; liv, hígado; ut, útero; ce, cérvix; re, recto; th, glándula tiroideas; te, testículos; sk, piel; sin, intestino delgado; pa, páncreas.

Figura 17: Interacción de R-espondinas con componentes del camino de señalización Wnt/ β -catenina

15 (A-C) Ensayo del informador luciferasa Wnt en células 293T co-transfectadas con los constructos indicados. Los resultados se indican como número de veces de estimulación respecto al informador solo. Las dosis de DNA eran 5 ng de *Wnt1*, 1 ng de *Fz8*, 3 ng de *LRP6*, 10 ng de *axina*, 10 ng de *dntcf3*, 5 ng de *dkk1*, 10 ng de *Xdsh* y 1 ng de *Wnt3a*.

20 Como se utiliza en esta memoria, el término "polipéptido" se refiere no sólo a polipéptidos codificados por las secuencias de nucleótidos/aminoácidos que se representan en la Figura 3 y/o 4, sino también a polipéptidos que difieren en la secuencia de aminoácidos debido a inserción, delección y/o sustitución de uno o más aminoácidos y que muestran al menos una actividad biológica de una Futrina, v.g. la capacidad de promover la señalización Wnt. Preferiblemente, los ácidos nucleicos y/o polipéptidos afines son ácidos nucleicos y/o polipéptidos cuya secuencia muestra una identidad de al menos 40%, en particular una identidad de al menos 65%, preferiblemente de al menos 80%, y de modo particularmente preferido de al menos 90% respecto a las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos codificados por las secuencias de nucleótidos que se muestran en Figura 3.

25 Las moléculas de ácido nucleico útiles como sondas pueden ser moléculas tanto de DNA como de RNA, siendo preferiblemente moléculas de DNA monocatenario. Las mismas pueden aislarse de fuentes naturales o pueden sintetizarse de acuerdo con métodos conocidos.

30 Como sonda de hibridación pueden utilizarse moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, que tienen una secuencia de nucleótidos que es exacta o básicamente complementaria a una secuencia de nucleótidos como la representada en las Figuras 3 y 4 o 6a, respectivamente, o partes de estas secuencias. Los fragmentos utilizados como sonda de hibridación pueden ser fragmentos sintéticos que se produjeron por medio de métodos de síntesis convencionales.

35 Como se utiliza en esta memoria, el término "hibridación" se refiere a hibridación en condiciones de hibridación convencionales, preferiblemente en condiciones rigurosas como se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Sin embargo, en ciertos casos, puede detectarse también una molécula de ácido nucleico hibridante en condiciones de hibridación de menor rigurosidad. Los cambios en la rigurosidad de hibridación y la detección de señales se realizan fundamentalmente por la manipulación de la concentración de formamida (los porcentajes menores de formamida dan como resultado una rigurosidad reducida), condiciones de sales, o temperatura. Por ejemplo, condiciones de rigurosidad menor incluyen una incubación durante una noche a 37°C en una solución que comprende 6X SSPE (20X SSPE = NaCl 3M; NaH₂PO₄ 9,2M; EDTA 0,02M, pH 7,4), SDS al 0,5%, formamida al 40 30%, 100 µg/ml de DNA bloqueante de esperma de salmón, seguido por lavados a 50°C con 1 X SSPE, SDS al 0,1%. Adicionalmente, para alcanzar una rigurosidad aún menor, los lavados efectuados después de hibridación rigurosa pueden realizarse a concentraciones mayores de sal (v.g. 5X SSC). Las variaciones en las condiciones anteriores pueden realizarse por la inclusión y/o sustitución de reactivos de bloqueo alternativos utilizados para suprimir el ruido de fondo en los experimentos de hibridación. La inclusión de reactivos de bloqueo específicos puede requerir una modificación de las condiciones de hibridación arriba descritas, debido a problemas con la compatibilidad.

45 El término "ligando", como se utiliza en esta memoria, hace referencia a cualquier molécula que sea capaz de fijarse específicamente a Futrina 2, permitiendo así determinar el nivel de moléculas receptoras. Ejemplos de tales moléculas incluyen anticuerpos, oligonucleótidos, proteínas o moléculas pequeñas. La molécula puede ser el ligando natural de Futrinas, o puede estar relacionada estrechamente con dicho ligando, v.g., un fragmento del ligando, o un sustrato natural, un mimético estructural o funcional; véase, v.g. Coligan, Current Protocols in Immunology 1 (2) (1991); Capítulo 5. En cualquier caso, la molécula puede aislarse o diseñarse racionalmente utilizando técnicas conocidas; véase también más adelante.

55 Preferiblemente, el ligando es un anticuerpo. El término "anticuerpo" se refiere preferiblemente a anticuerpos que están constituidos esencialmente por anticuerpos monoclonales agrupados con especificidades de epítipo diferentes, así como preparaciones de anticuerpos monoclonales distintas. Los anticuerpos monoclonales se producen a partir de un antígeno que contiene Futrina 1, 2, 3 ó 4 o fragmentos del mismo por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, v.g., Köhler et al., Nature 256 (1975), 495). Como se utiliza en esta

memoria, el término "anticuerpo" (Ab) o "anticuerpo monoclonal" (Mab) debe entenderse que incluye moléculas intactas así como fragmentos de anticuerpo (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂) que son capaces de fijarse específicamente a Futrina 1, 2, 3 y/o 4. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se aclaran más rápidamente de la circulación, y pueden tener menos fijación de tejido inespecífico que un anticuerpo intacto. (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)). Así pues, se prefieren estos fragmentos, así como los productos de un banco de expresión de FAB u otra inmunoglobulina. Además, los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos, monocatenarios, y humanizados.

Para ciertos propósitos, v.g. métodos de diagnóstico, la molécula de ácido nucleico utilizada como sonda o el ligando, v.g., anticuerpo, pueden marcarse de modo detectable, por ejemplo, con un radioisótopo, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto fluorescente, un quelato metálico, o una enzima.

Los fragmentos de ácido nucleico pueden utilizarse, por ejemplo, como sondas o cebadores en los ensayos de diagnóstico descritos más adelante y hacen posible, v.g., el análisis de la expresión de Futrina 1, 2, 3, ó 4 por determinación del nivel de mRNA o la determinación de mutaciones en la región codificante o regiones reguladoras que conducen a moléculas de polipéptido con actividad alterada, v.g. destruida, o que conducen a expresión alterada. Preferiblemente, las moléculas de ácido nucleico son oligonucleótidos que tienen una longitud de al menos 10, en particular de al menos 15 y de modo particularmente preferido de al menos 50 nucleótidos. Estas moléculas de ácido nucleico de la invención pueden utilizarse también, por ejemplo, como cebadores para una reacción PCR.

En una realización preferida, la diana a la que se hibrida la molécula de ácido nucleico es un mRNA.

También se proporciona un método de diagnosis de una enfermedad asociada con (a) la expresión aberrante de Futrina 1, 2, 3 ó 4 y/o (b) actividades o cantidades aberrantes de un polipéptido de Futrina 1, 2, 3, ó 4 en un individuo, que comprende:

(a) determinar (a) la cantidad de expresión de Futrina 1, 2, 3 ó 4 y/o (b) la cantidad de polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 biológicamente activo en una muestra biológica; y

(b) diagnosticar una enfermedad asociada con (a) la expresión aberrante de *Futrina* 1, 2, 3 y/o 4 y/o (b) actividades o cantidades aberrantes de un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 o un riesgo para el desarrollo de dicha enfermedad basado en una cantidad de expresión alterada de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 y/o (b) actividades o cantidades alteradas de polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 biológicamente activo comparadas con un control.

Formatos de ensayo adecuados son bien conocidos por las personas expertas en la técnica y, adicionalmente, se describen más adelante. Muestras de control positivas adecuadas que expresan proteínas Futrina humanas son, v.g., las células HEK293.

El polipéptido de Futrina 1, 2, 3 ó 4 o el mRNA correspondiente v.g. en fluidos o tejidos biológicos, puede detectarse directamente in situ, v.g., por hibridación in situ, o puede aislarse de otros componentes celulares por métodos comunes conocidos por los expertos en la técnica antes de ponerse en contacto con una sonda. Métodos de detección incluyen análisis por transferencia Northern, protección de RNasa, métodos in situ, v.g. hibridación in situ, métodos de amplificación in vitro (PCR, LCR, QRNA-replicasa o transcripción/amplificación de RNA (TAS, 3SR), transferencia inversa por puntos descrita en EP-B1 0 237 362), inmunoensayos, transferencia Western y otros ensayos de detección que son conocidos por los expertos en la técnica.

La sonda (v.g. un anticuerpo específico u oligonucleótido específico) de la composición de diagnóstico puede estar marcada de forma detectable. En una realización preferida, dicha composición de diagnóstico contiene un anticuerpo anti-Futrina 1, 2, 3 y/o 4 y permite dicha diagnosis, v.g. por ELISA y contiene el anticuerpo fijado a un soporte sólido, por ejemplo una placa de microtitulación de poliestireno o papel de nitrocelulosa, utilizando métodos conocidos en la técnica. Alternativamente, dichas composiciones de diagnóstico están basadas en un RIA y contienen dicho anticuerpo marcado con un isótopo radiactivo. Marcadores de ensayo de anticuerpos adecuados se conocen en la técnica e incluyen marcadores enzimáticos, tales como, glucosa-oxidasa, y radioisótopos, tales como yodo (¹²⁵I, ¹²¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹¹²In), y tecnecio, rodamina y biotina. Además de ensayar los niveles de Futrina en una muestra biológica, el polipéptido puede detectarse también in vivo por formación de imagen. Identificadores o marcadores de anticuerpos para la obtención de imágenes in vivo de proteínas incluyen los detectables por radiografía de rayos X, NMR O ESR. Para la radiografía de rayos X, marcadores adecuados incluyen radioisótopos tales como bario o cesio, que emiten radiación detectable, pero no son abiertamente nocivos para el individuo. Marcadores adecuados para NRM y ESR incluyen aquéllos que tienen un espín característico detectable, tal como deuterio, que pueden incorporarse en el anticuerpo por marcación de nutrientes para el hibridoma relevante. Se introduce en el mamífero (por ejemplo, por vía parenteral, subcutánea o intraperitoneal) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico de proteína que ha sido marcado con un resto detectable de formación de imágenes apropiado, tal como un radioisótopo (por ejemplo ¹³¹I, ¹¹²In, ^{99m}Tc), una sustancia radio-opaca, o un material detectable por resonancia magnética nuclear. Se comprenderá en la técnica que el tamaño del individuo y el sistema de obtención de imágenes utilizado determinarán la cantidad del resto de formación de imagen necesaria para producir imágenes de diagnóstico. En el caso de un resto de radioisótopo, para un individuo humano, la

cantidad de radiactividad inyectada estará comprendida normalmente entre aproximadamente 5 y 20 milicurios de ^{99m}Tc. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo marcado se acumula luego preferentemente en la localización de las células que contienen el polipéptido de Futrina específico. La obtención de imágenes de tumores in vivo se describe, v.g., en S.W. Burchiel et al., Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments". (Capítulo 13 en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel y B.A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982)).

Se describe un método para identificar una pareja de fijación para un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4:

- (a) poner en contacto dicho polipéptido con un compuesto a cribar; y
- (b) determinar si el compuesto afecta a una actividad del polipéptido.

10 La invención incluye también un método de identificación de compuestos que se fijan a un polipéptido de Futrina 2, que comprende los pasos de:

- (a) incubar un compuesto de fijación candidato con dicho polipéptido; y
- (b) determinar si se ha producido fijación.

15 Los polipéptidos de Futrina 1, 2, 3 ó 4 pueden utilizarse para el cribado de proteínas u otros compuestos que se fijan a Futrina 1, 2, 3 ó 4 o de proteínas u otros compuestos a los cuales se fija Futrina 1, 2, 3 y/o 4. La fijación de Futrina 1, 2, 3 ó 4 y la molécula puede activar (agonista), aumentar, inhibir (antagonista) o reducir la actividad de Futrina 1, 2, 3 ó 4 o de la molécula fijada. Ejemplos de tales moléculas incluyen anticuerpos, oligonucleótidos, proteínas (v.g. ligandos), o moléculas pequeñas.

20 Ventajosamente, la molécula está estrechamente relacionada con el ligando natural de Futrina 1, 2, 3 ó 4, v.g., un fragmento del ligando, o un sustrato natural, un ligando, un mimético estructural o funcional; véase, v.g., Colligan, Current Protocols in Immunology 1(2) (1991); Capítulo 5.

25 Preferiblemente, el cribado para estas moléculas implica producir células apropiadas que expresan Futrina 1, 2, 3 y/o 4 como una proteína secretada o en la membrana celular. Células preferidas incluyen células de mamíferos, levadura, Drosophila o E. coli. Las células que expresan Futrina 1, 2, 3 y/o 4 (o la membrana celular que contiene el polipéptido expresado) se ponen luego preferiblemente en contacto con un compuesto de ensayo que contiene potencialmente la molécula para observar la fijación, estimulación o inhibición de la actividad de Futrina 1, 2, 3 y/o 4.

30 El ensayo puede testar simplemente la fijación de un compuesto candidato a Futrina 1, 2, 3 y/o 4, en donde la fijación es detectada por un marcador, o en un ensayo que implica la competición con un competidor marcado. Adicionalmente, el ensayo puede testar si el compuesto candidato da como resultado una señal generada por fijación a Futrina 1, 2, 3 y/o 4. Ensayos adecuados para analizar la actividad de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 incluyen ensayos de informadores de luciferasa inducibles por Wnt en células HEK293 transfectadas, en que Futrina 1, 2, 3 y/o 4 actúa sinérgicamente con Wnt para aumentar una señal inducida por Wnt, tal como se muestra en la Figura 4.

35 Alternativamente, el ensayo puede llevarse a cabo utilizando preparaciones exentas de células, polipéptido/molécula fijado a un soporte sólido, bancos químicos, o mezclas de productos naturales. El ensayo puede comprender también simplemente los pasos de mezclar un compuesto candidato con una solución que contiene Futrina 1, 2, 3 y/o 4, medir la actividad o fijación Futrina/molécula, y comparar la actividad o fijación Futrina/molécula con un estándar.

40 Un ensayo ELISA puede medir el nivel o actividad de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 en una muestra (v.g. muestra biológica) utilizando un anticuerpo monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede medir el nivel o actividad de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 por fijación, directa o indirectamente, a Futrina 1, 2, 3 y/o 4 o por competición con Futrina 1, 2, 3 y/o 4 por un sustrato. La totalidad de estos ensayos anteriores pueden utilizarse como marcadores de diagnóstico o pronóstico. Las moléculas descubiertas utilizando estos ensayos pueden utilizarse para tratar enfermedades o para producir un resultado particular en un paciente (v.g. eliminación de un tumor, soporte de procesos regenerativos, etc.) por modulación, preferiblemente activación de la molécula de Futrina 1, 2, 3 y/o 4. Además, los ensayos pueden descubrir agentes que pueden inhibir o intensificar la producción de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 a partir de células o tejidos manipulados convenientemente.

Además, la invención incluye un método de identificación de activadores/agonistas o inhibidores/antagonistas de un polipéptido de Futrina 2, que comprende los pasos de:

- (a) incubar un compuesto candidato con dicho polipéptido;
- 50 (b) ensayar una actividad biológica, y
- (c) determinar si se ha alterado una actividad biológica de dicho polipéptido.

Ensayos adecuados para analizar la actividad de Futrina 2 incluyen ensayos de informadores de luciferasa

inducibles por Wnt en células HEK293 transfectadas, en donde Futrina 2 actúa sinérgicamente con Wnt para aumentar una señal inducida por Wnt, tal como se muestra en la Figura 4.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un método de identificación y obtención de un fármaco candidato para la terapia de enfermedades asociadas con (a) una expresión aberrante de Futrina 2 y/o (b) actividades o cantidades aberrantes de un polipéptido de Futrina 2, que comprende los pasos de:

(a) poner en contacto un polipéptido de Futrina 2 o una célula que expresa dicho polipéptido, y opcionalmente el o los ligandos correspondientes, en presencia de componentes capaces de proporcionar una señal detectable en respuesta a la fijación a dicho fármaco candidato a cribar; y

(b) detectar la presencia o ausencia de una señal o el aumento de la señal generada, en donde la presencia o aumento de la señal es indicativa de un fármaco supuesto.

Ensayos para analizar la actividad de Futrina 2 son ensayos informadores de luciferasa inducibles por Wnt en células HEK283 transfectadas, en donde Futrina 2 actúa sinérgicamente con Wnt para aumentar una señal inducida por Wnt, tal como se muestra en la Figura 5.

El fármaco candidato puede ser un solo compuesto o una pluralidad de compuestos. El término "pluralidad de compuestos" en un método de la invención debe entenderse como una pluralidad de sustancias que pueden ser o no idénticas.

Dicho compuesto o pluralidad de compuestos puede(n) sintetizarse químicamente o producirse microbiológicamente y/o pueden estar comprendidos en, por ejemplo, muestras, v.g. extractos de células de, v.g., plantas, animales o microorganismos. Adicionalmente, dicho o dichos compuestos pueden ser conocidos en la técnica, pero no conocidos hasta ahora como capaces de reprimir o activar polipéptidos de Futrina 2. La mezcla de reacción puede ser un extracto exento de células o puede comprender un cultivo de células o tejidos. Montajes adecuados para el método de la invención son conocidos por las personas expertas en la técnica y se describen, por ejemplo, generalmente en Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, tercera edición (1994) y en los ejemplos adjuntos. La pluralidad de compuestos puede añadirse, v.g., a la mezcla de reacción, al medio de cultivo, puede inyectarse en una célula o puede aplicarse de otro modo a un animal transgénico. La célula o tejido que puede emplearse en el método de la invención es preferiblemente una célula hospedadora, célula de mamífero o animal no humano transgénico.

Si una muestra que contiene un compuesto o una pluralidad de compuestos se identifica en el método de la invención, entonces es posible aislar el compuesto de la muestra original identificada por contener el compuesto capaz de reprimir o activar un polipéptido de Futrina 2, o puede subdividirse ulteriormente la muestra original, por ejemplo, si la misma está constituida por una pluralidad de compuestos diferentes, a fin de reducir el número de sustancias diferentes por muestra y repetir el método con las subdivisiones de la muestra original. Dependiendo de la complejidad de las muestras, los pasos arriba descritos pueden realizarse varias veces, preferiblemente hasta que la muestra identificada de acuerdo con el método de la invención comprenda solamente un número limitado de o únicamente una sustancia o sustancias. Preferiblemente, dicha muestra comprende sustancias de propiedades químicas y/o físicas similares, y muy preferiblemente dichas sustancias son idénticas.

Se conocen varios métodos por las personas expertas en la técnica para producir y cribar grandes bancos a fin de identificar compuestos que tengan afinidad específica para una diana. Estos métodos incluyen el método de presentación de fago, en el cual péptidos aleatorizados se presentan en fago y se criban por cromatografía de afinidad a un receptor inmovilizado; véanse, v.g., los documentos WO 91/17271, WO 92/01047, US-A-5.223.409. En otro enfoque, se sintetizan bancos combinatorios de polímeros inmovilizados en un chip utilizando fotolitografía; véanse, v.g. los documentos US-A-5.143.854, WO 90/15070 y WO 92/10092. Los polímeros inmovilizados se ponen en contacto con un receptor marcado y se escanean respecto al marcador a fin de identificar polímeros que se fijen al receptor. La síntesis y el cribado de bancos de péptidos sobre soportes continuos de membrana de celulosa que pueden utilizarse para identificar ligandos de fijación de los polipéptidos de Futrina 2 y, por consiguiente, posibles inhibidores y activadores, se describen, por ejemplo, en Kramer, *Methods Mol. Biol.* 87 (1998), 25-39. Este método puede utilizarse también, por ejemplo, para determinar los sitios de fijación y los motivos de reconocimiento en el polipéptido de Futrina 2. De modo análogo, se determinó la especificidad del sustrato de la chaperona DnaK y los sitios de contacto entre la interleuquina-6 humana y su receptor; véase Rudiger, *EMBO J.* 16 (1997), 1501-1507 y Weiergraber, *FEBS Lett.* 379 (1996), 122-126, respectivamente. Además, los métodos arriba mencionados pueden utilizarse para la construcción de supertopos de fijación derivados del polipéptido de Futrina 2. Un enfoque similar se describió con éxito para antígenos peptídicos del anticuerpo monoclonal anti-p24 (HIV-1); véase Kramer, *Cell* 91 (1997), 799-809. Una ruta general para análisis de la huella dactilar de las interacciones péptido-anticuerpo utilizando la biblioteca de aminoácidos peptídicos agrupados se describió en Kramer, *Mol. Immunol.* 32 (1995), 459-465. Adicionalmente, antagonistas de un polipéptido de Futrina 2 puede derivarse e identificarse a partir de anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con un polipéptido de Futrina 2 de acuerdo con los métodos que se describen en Doring, *Mol. Immunol.* 31 (1994), 1059-1067. Todos estos métodos pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención a fin de identificar activadores/agonistas e inhibidores/antagonistas de un polipéptido de Futrina 2.

Pueden emplearse diversas fuentes de la estructura básica de un activador o inhibidor de esta clase y comprenden, por ejemplo, análogos miméticos de un polipéptido de Futrina 2. Análogos miméticos de un polipéptido de Futrina 2 o fragmentos biológicamente activos de los mismos pueden generarse mediante, por ejemplo, sustitución de los aminoácidos que se espera sean esenciales para la actividad biológica con, v.g., estereoisómeros, es decir, D-aminoácidos; véase, v.g., Tsukida, J. *Med. Chem.* 40 (1997), 3534-3541. Adicionalmente, en el caso de que se utilicen fragmentos para el diseño de análogos biológicamente activos, pueden incorporarse componentes pro-miméticos en un péptido a fin de restablecer al menos algunas de las propiedades estructurales que pueden haberse perdido por la eliminación de parte del polipéptido original; véase, v.g., Nachman, *Regul. Pept.* 57 (1995), 359-370. Adicionalmente, puede utilizarse un polipéptido de Futrina 2 para identificar miméticos peptídicos químicos sintéticos que se fijan a o pueden funcionar como un ligando, sustrato o pareja de fijación de dicho o dichos polipéptidos tan eficazmente como lo hace el polipéptido natural; véase, v.g. Engleman, *J. Clin. Invest.* 99 (1997), 2284-2292. Por ejemplo, pueden realizarse simulaciones de plegamiento y rediseño por computadora de motivos estructurales de un polipéptido de Futrina 2 utilizando programas de computadora apropiados (Olszewski, *Proteins* 25 (1996), 286-299; Hoffman, *Comput. Appl. Biosci.* 11 (1995), 675-679). La modelización por computadora del plegamiento de las proteínas puede utilizarse para el análisis estructural y energético de modelos detallados de péptidos y proteínas (Monge, *J. Mol. Biol.* 247 (1995), 995-1012; Renouf, *Adv. Exp. Med. Biol.* 376 (1995), 37-45). En particular, los programas apropiados pueden utilizarse para la identificación de sitios interactivos de un polipéptido de Futrina 2 y su ligando u otras proteínas interaccionantes por búsquedas con ayuda de computadora para secuencias de péptidos complementarias (Fassina, *Immunomethods* 5 (1994), 114-120. Sistemas adicionales de computadora apropiados para el diseño de proteínas y péptidos se describen en la técnica anterior, por ejemplo en Berry, *Biochem. Soc. Trans.* 22 (1994), 1033-1036; Wodak, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 501 (1987), 1-13; Pabo, *Biochemistry* 25 (1986), 5987-5991. Los resultados obtenidos a partir de los análisis por computadora arriba descritos pueden utilizarse para, v.g., la preparación de miméticos peptídicos de un polipéptido de Futrina 2 o fragmentos del mismo. Tales análogos pseudopeptídicos de la secuencia natural de aminoácidos de la proteína pueden mimetizar muy eficazmente la proteína parental (Benkirane, *J. Biol. Chem.* 271 (1996), 33218-33224). Por ejemplo, la incorporación de residuos de α -aminoácidos aquirales fácilmente disponibles en un polipéptido de Futrina 2 o un fragmento del mismo da como resultado la sustitución de enlaces amídicos por unidades polimetileno de una cadena alifática, proporcionando con ello una estrategia conveniente para la construcción de un mimético peptídico (Banerjee, *Biopolymers* 39 (1996), 769-777). Análogos péptido-miméticos superactivos de pequeñas hormonas peptídicas en otros sistemas se describen en la técnica anterior (Zhang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224 (1996), 327-331). Miméticos peptídicos apropiados de un polipéptido de Futrina 2 pueden identificarse también por la síntesis de bancos combinatorios de miméticos peptídicos mediante alquilación sucesiva de amidas y testado de los compuestos resultantes, v.g., en cuanto a sus propiedades de fijación e inmunológicas. Métodos para la generación y el uso de bancos péptido-miméticos combinatorios se describen en la técnica anterior, por ejemplo en Ostresh, *Methods in Enzymology* 267 (1996), 220-234 y Dorner, *Bioorg. Med. Chem.* 4 (1996), 709-715. Adicionalmente, una estructura tridimensional y/o cristalográfica de un polipéptido de Futrina 2 puede utilizarse para el diseño de inhibidores miméticos y péptidos de la actividad biológica del polipéptido (Rose, *Biochemistry* 35 (1996), 12933-12944; Rutenber, *Bioorg. Med. Chem.* 4 (1996), 1545-1558).

Es también bien conocido por las personas expertas en la técnica que es posible diseñar, sintetizar y evaluar miméticos de compuestos orgánicos pequeños que, por ejemplo, puedan actuar como un sustrato o ligando para un polipéptido de Futrina 2. Por ejemplo, se ha descrito que miméticos D-glucosídicos de hapalosina exhibían una eficiencia similar a la hapalosina en la antagonización de proteínas de resistencia a multifármacos asociada a asistencia en citotoxicidad; véase Dinh, *J. Med. Chem.* 41 (1998), 981-987.

La molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de Futrina 2 puede servir también como diana para activadores e inhibidores. Los activadores pueden comprender, por ejemplo, proteínas que se fijan al mRNA de un gen codificante de un polipéptido de Futrina 2, estabilizando con ello la conformación nativa del mRNA y facilitando la transcripción y/o la traducción, v.g., de manera análoga a como actúa la proteína Tat sobre el RNA de HIV. Adicionalmente, se describen en la bibliografía métodos para la identificación de moléculas de ácido nucleico tales como un fragmento de RNA que mimetiza la estructura de una molécula de RNA diana definida o indefinida a la cual se fija un compuesto en el interior de una célula, dando como resultado el retardo del crecimiento celular o la muerte celular; véase, v.g., WO 98/18947 y las referencias citadas en el mismo. Estas moléculas de ácido nucleico pueden utilizarse para la identificación de compuestos desconocidos de interés farmacéutico, y para la identificación de dianas de RNA desconocidas para uso en el tratamiento de una enfermedad. Estos métodos y composiciones pueden utilizarse en el cribado para nuevos compuestos o para la identificación de compuestos útiles a fin de alterar los niveles de expresión de polipéptidos codificados por una molécula de ácido nucleico. Alternativamente, por ejemplo, la estructura de conformación del fragmento de RNA que mimetiza el sitio de fijación puede emplearse en el diseño racional de fármacos a fin de modificar fármacos conocidos para hacer que los mismos se fijen más ávidamente a la diana. Una metodología de este tipo es la resonancia magnética nuclear (NMR), que es útil para identificar estructuras de conformación de fármacos y RNA. Todavía otros métodos son, por ejemplo, los métodos de diseño de fármacos que se describen en los documentos WO 95/35367, US-A-5322933, en donde puede deducirse la estructura cristalina del fragmento de RNA y se utilizan programas de computadora para diseñar nuevos compuestos de fijación.

Los compuestos que pueden testarse e identificarse de acuerdo con un método de la invención pueden ser bancos

de expresión, v.g. bancos de expresión de cDNA, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, pequeños compuestos orgánicos, hormonas, peptidomiméticos, PNAs o análogos (Milner, *Nature Medicine* 1 (1995), 879-880; Hupp, *Cell* 83 (1995), 237-245; Gibbs, *Cell* 79 (1994), 193-199 y las referencias citadas supra). Adicionalmente, genes que codifican un regulador supuesto de un polipéptido de Futrina 2 y/o que ejercen sus efectos aguas arriba o aguas abajo de un polipéptido de Futrina 2 pueden identificarse utilizando, por ejemplo, mutagénesis de inserción en la que se utilizan, por ejemplo, vectores de direccionamiento de genes conocidos en la técnica. Dichos compuestos pueden ser también derivados funcionales o análogos de inhibidores o activadores conocidos. Tales compuestos útiles pueden ser, por ejemplo, factores de transacción que se fijan a un polipéptido de Futrina 2 o secuencias reguladoras del gen que codifica el mismo. La identificación de factores de transacción puede realizarse utilizando métodos estándar en la técnica, (véase, v.g., Sambrook, supra). Para determinar si una proteína se fija a la poliproteína propiamente dicha o a secuencias reguladoras, pueden llevarse a cabo análisis estándar de desplazamiento en gel nativo. Con objeto de identificar un factor de transacción que se fija a la proteína o secuencia reguladora, la proteína o secuencia reguladora puede utilizarse como reactivo de afinidad en métodos estándar de purificación de proteínas, o como una sonda para cribado de un banco de expresión. La identificación de moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos que interactúan con un polipéptido de Futrina 2 arriba descrito puede realizarse también, por ejemplo, como se describe en Scofield (*Science* 274 (1996), 2063-2065) mediante el uso del denominado "sistema de dos híbridos" de levadura. En este sistema, el polipéptido de Futrina 2 o una parte más pequeña del mismo se enlaza al dominio de fijación de DNA del factor de transcripción GAL4. Una cepa de levadura que expresa este polipéptido de fusión y que comprende un gen informador lacZ dirigido por un promotor apropiado, que es reconocido por el factor de transcripción GAL4, se transforma con un banco de cDNAs que expresará proteínas de plantas o péptidos de las mismas fusionados a un dominio de activación. Así, si un péptido codificado por uno de los cDNAs es capaz de interactuar con el péptido de fusión que comprende un péptido de un polipéptido de Futrina 2, el complejo es capaz de dirigir la expresión del gen informador. De este modo, las moléculas de ácido nucleico que codifican Futrina 2, respectivamente, y el péptido codificado pueden utilizarse para identificar péptidos y proteínas que interactúan con un polipéptido de Futrina 2.

Una vez que se ha identificado el factor de transacción, puede proseguirse con la modulación de su fijación a o la regulación de la expresión de un polipéptido de Futrina 2, comenzando, por ejemplo, con el cribado de inhibidores contra la fijación del factor de transacción a un polipéptido de Futrina 2. La activación o represión de un polipéptido de Futrina 2 podría realizarse luego en animales por aplicación del factor de transacción (o su inhibidor) o el gen que codifica el mismo, v.g. en un vector de expresión. Adicionalmente, si la forma activa del factor de transacción es un dímero, podrían construirse imitantes dominantes negativos del factor de transacción a fin de inhibir su actividad. Adicionalmente, después de la identificación del factor de transacción, pueden identificarse luego componentes adicionales en la cascada de señales que conduce a la activación (v.g. transducción de la señal) o represión de un gen implicado en el control de un polipéptido de Futrina 2. La modulación de las actividades de estos componentes puede proseguirse luego, a fin de desarrollar fármacos adicionales y métodos para modulación del metabolismo de la degradación de las proteínas en los animales. Así pues, la presente invención se refiere también al uso de sistema de dos híbridos como se ha definido arriba para la identificación de activadores o inhibidores de un polipéptido de Futrina 2.

Los compuestos aislados por los métodos arriba indicados sirven también como compuestos cabeza de serie para el desarrollo de compuestos análogos. Los análogos deberían tener una configuración electrónica estabilizada y conformación molecular que permita que grupos funcionales clave se presenten a un polipéptido de Futrina 2 o su ligando sustancialmente del mismo modo que el compuesto cabeza de serie. En particular, los compuestos análogos tienen propiedades electrónicas espaciales que son comparables a la región de fijación, pero pueden ser moléculas más pequeñas que el compuesto cabeza de serie, teniendo frecuentemente un peso molecular inferior a aproximadamente 2 kD y preferiblemente inferior a aproximadamente 1 kD. La identificación de compuestos análogos puede realizarse mediante el uso de técnicas tales como análisis de campo autoconsistente (SCF), análisis de interacción de configuración (CI), y análisis de dinámica en modo normal. Están disponibles programas de computadora para la implementación de estas técnicas; v.g., Rein, *Computer-Assisted Modeling of Receptor-Ligand Interactions* (Alan Liss, Nueva York, 1989). Métodos para la preparación de derivados químicos y análogos son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Beilstein, *Handbook of Organic Chemistry*, Springer edition, New York Inc., 175 Fifth Avenue, Nueva York, N.Y. 10010 EE.UU. y *Organic Synthesis*, Wiley, Nueva York, EE.UU. Adicionalmente, dichos derivados y análogos pueden testarse respecto a sus efectos de acuerdo con métodos conocidos en la técnica; véase también supra. Adicionalmente, pueden utilizarse peptidomiméticos y/o diseño ayudado por computadora de derivados apropiados y análogos, por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

Una vez que el compuesto descrito ha sido identificado y obtenido, el mismo se proporciona preferiblemente en una forma terapéuticamente aceptable.

De acuerdo con ello, se describe una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de Futrina 2, un polipéptido de Futrina 2 propiamente dicho, vector recombinante (para ejemplos, véase más adelante), anticuerpo, activador/agonista, inhibidor/antagonista y/o pareja de fijación de un polipéptido de Futrina 2 y un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Preferiblemente, para propósitos terapéuticos, el polipéptido de Futrina 2 se produce recombinantemente por el uso

de las secuencias de ácido nucleico que se muestran en las Figuras 1 y 2. Vectores adecuados para la expresión recombinante son conocidos por las personas expertas en la técnica. Preferiblemente, los mismos son plásmidos, cósmidos, virus, bacteriófagos y otros vectores utilizados usualmente en el campo de la ingeniería genética. Vectores adecuados para uso incluyen, pero sin carácter limitante, el vector de expresión basado en T7 para la expresión en células de mamífero y vectores derivados de baculovirus para expresión en células de insectos. Con preferencia, la molécula de ácido nucleico está enlazada operativamente a los elementos reguladores en el vector recombinante que garantizan la transcripción y síntesis de un mRNA en células procariotas y/o eucariotas que puede traducirse. La secuencia de nucleótidos a transcribir puede estar enlazada operativamente a un promotor tal como un promotor T7, metalotioneína I o polihedrina. Las células hospedadoras utilizadas para la expresión recombinante son células procariotas o eucariotas, por ejemplo células de mamíferos, células bacterianas, células de insectos o células de levaduras. El polipéptido se aísla de las células cultivadas y/o del medio de cultivo. El aislamiento y la purificación del polipéptido producido recombinantemente pueden llevarse a cabo por medios convencionales que incluyen cromatografía preparativa y separaciones por afinidad e inmunológica utilizando, v.g., un anticuerpo anti-Futrina 2 o, v.g., pueden purificarse sustancialmente por el método de un solo paso descrito en Smith y Johnson, Gene 67; 31-40 (1988).

Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados, etc. son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Tales vehículos pueden formularse por métodos convencionales y se pueden administrar al individuo en una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas puede efectuarse por diferentes vías, v.g. mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. La ruta de administración, por supuesto, depende de la naturaleza de la enfermedad y de la clase de compuesto contenida en la composición farmacéutica. El régimen de dosificación será determinado por el médico encargado del caso y otros factores clínicos. Como es bien conocido en las ciencias médicas, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, e incluyen el volumen del paciente, la superficie corporal, la edad, el sexo, el compuesto particular a administrar, el tiempo y la vía de administración, la clase y estadio de la enfermedad, v.g., tumores, salud general y otros fármacos que se administren simultáneamente.

El suministro de las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de Futrina 2 puede realizarse por aplicación directa o, preferiblemente, por utilización de un vector de expresión recombinante tal como un virus quimérico que contenga estos compuestos o un sistema de dispersión coloidal. La aplicación directa al sitio diana puede realizarse, v.g., por suministro balístico, como un sistema de dispersión coloidal o mediante catéter a un sitio en una arteria. Los sistemas de dispersión coloidal que pueden utilizarse para suministro de las moléculas de ácido nucleico anteriores incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, cuentas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua (mixtas), micelas, liposomas y lipoplexos. El sistema coloidal preferido es un liposoma. Pueden utilizarse liposomas específicos de órganos o específicos de células a fin de conseguir el suministro solamente al tejido deseado. El direccionamiento de los liposomas puede ser realizado por la persona experta en la técnica mediante aplicación de métodos de conocimiento común. Este direccionamiento incluye direccionamiento pasivo (utilizando la tendencia natural de los liposomas al distribuirse a las células del RES en órganos que contienen capilares sinusoidales) o direccionamiento activo (por ejemplo por acoplamiento del liposoma a un ligando específico, v.g., un anticuerpo, un receptor, azúcar, glicolípido, proteína, etc., por métodos bien conocidos). Se utilizan preferiblemente anticuerpos monoclonales para direccionar los liposomas a tejidos específicos, v.g. un tejido tumoral, por la vía de ligandos específicos de la superficie celular.

Vectores recombinantes útiles para la terapia génica son vectores virales, v.g. adenovirus, virus herpes, vaccinia, o, más preferiblemente, un virus de RNA tal como un retrovirus. Aún más preferiblemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Ejemplos de tales vectores retrovirales que pueden utilizarse son: el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), el virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), el virus del tumor mamario murino (MuMTV) y el virus del sarcoma de Rous (RSV). Muy preferiblemente, se emplea un vector retroviral de primate no humano, tal como el virus de la leucemia del gibón (GaLV), que proporciona un intervalo de hospedadores más amplio comparado con los vectores murinos. Dado que los retrovirus recombinantes son defectuosos, se requiere asistencia a fin de producir partículas infecciosas. Dicha asistencia puede ser proporcionada, v.g., utilizando líneas de células adyuvantes que contienen plásmidos que codifican la totalidad de los genes estructurales del retrovirus bajo el control de secuencias reguladoras incluidas en la LTR. Líneas de células adyuvantes adecuadas son bien conocidas por los expertos en la técnica. Dichos vectores pueden contener adicionalmente un gen que codifica un marcador seleccionable de tal modo que las células transducidas puedan identificarse. Además, los vectores retrovirales pueden modificarse de tal modo que los mismos se vuelvan específicos de la diana. Esto puede conseguirse, v.g., por inserción de un polinucleótido que codifique un azúcar, un glicolípido, o una proteína, preferiblemente un anticuerpo. Los expertos en la técnica conocen métodos adicionales para la generación de vectores específicos de dianas. Otros vectores adecuados y métodos para la terapia in vitro o in vivo se describen en la bibliografía y son conocidos por las personas expertas en la técnica; véase, v.g., WO 94/29469 o WO 97/00957.

Con objeto de conseguir expresión únicamente en el órgano diana, v.g., un tumor a tratar, las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de Futrina 2 pueden enlazarse a un promotor específico de tejido y utilizarse para la terapia génica. Tales promotores son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, v.g. Zimmermann

et al, (1994) *Neuron* 12,11-24; Vidal et al., (1990) *EMBO J.* 9, 883-840; Mayford et al., (1995), *Cell* 81, 891-904; Pinkert et al, (1987) *Genes & Dev.* 1, 268-76).

La presente invención se refiere también al uso de los compuestos de la invención arriba indicados para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad asociada con (a) expresión aberrante de Futrina 2 y/o genes implicados en la cascada de señales Wnt, y/o (b) actividades o cantidades aberrantes de una Futrina 2 y/o un polipéptido implicado en la cascada de señales Wnt. En una realización preferida, dicha enfermedad es una enfermedad renal, ósea o muscular o tumor, preferiblemente cáncer de mama, un carcinoma de colon o un melanoma.

Finalmente, la presente invención se refiere al uso de una molécula nucleotídica que codifica un polipéptido que tiene una actividad biológica de un polipéptido de Futrina 2, un activador/agonista de un polipéptido de Futrina 2 o pareja de fijación de dicho o dichos polipéptidos para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir la cascada de señales Wnt que podría ser útil para soportar procesos regenerativos en un paciente, v.g., crecimiento de tejido tal como músculo, hueso, cabello, etc.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1

Materiales y Métodos

(A) Aislamiento de Futrirías (= *R-espondinas*) y constructos

Se utilizó un banco de cDNA de ojos de *Xenopus* adulto en pCS2+ a fin de preparar agrupaciones de aproximadamente 250 colonias. Se transfectó transitoriamente DNA plasmídico de cada agrupación a células 293T junto con el receptor de Wnt *frizzled8*, el informador de Wnt TOPFLASH (Korinek et al, *Science* 275 (1997), 1784-7) y pRL-TK (Promega) utilizando el reactivo de transfección FuGENE6 (Roche). El ensayo de luciferasa se realizó 24 horas después de la transfección. Se aisló un clon positivo de la agrupación por selección de consanguinidad. Se obtuvieron cDNAs humanos de *Rspo2* y 3 del RZPD. Fragmentos de *hRspo1* y 4 se amplificaron por RT-PCR a partir del mRNA de células 293T y se utilizaron como sondas de hibridación. Se aislaron *Rspo1* y 2 de ratón de longitud total a partir de un banco de cDNA de embrión de ratón de 13,5 días. La secuencia de *X. tropicalis Rspo3* se obtuvo de la base de datos del Instituto Sanger y un fragmento de cDNA se clonó por RT-PCR a partir de embriones de *X. tropicalis*. Se crearon constructos C-terminales marcados con Myc o FLAG y todos los constructos de delección por PCR. Se clonó *Rspo2ΔC* de *Xenopus* por delección de los últimos 37 aminoácidos. Los cDNAs de *Rspo3* se clonaron en vectores pCS2+ y Bluescript para uso en expresión génica y como sondas, respectivamente.

(B) Cultivo de células, proteínas recombinantes y ensayos informadores de luciferasa

Se mantuvieron líneas de células HER293T, SHEP y HeLa en DMEM, FCS al 10% y 10% de CO₂. Se produjo medio acondicionado *Rspo2ΔC* de *Xenopus* por transfección transitoria en células 293T. Se produjo medio acondicionado Wnt3a de ratón a partir de células L de ratón transfectadas establemente con Wnt3a (ATCC nº CRL-2647) (Shibamoto et al, *Genes Cells* 3 (1998), 659-670). Los ensayos con el informador luciferasa en células 293T se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos como se ha descrito (Wu et al, *Curr. Biol.* 10 (2000), 1611-1614). Los ensayos con el informador luciferasa en células HeLa se llevaron a cabo en placas de 24 pocillos por triplicado utilizando reactivo de transfección Lipofectamine Plus (Invitrogen). Se transfectaron por pocillo un total de 400 ng de DNA, incluyendo 80 ng de *7lef-fos-Luc* (Novak et al, *PNAS* 95 (1998), 4374-4379), 10 ng de *pRL-TK*, 10 ng de *frizzled8* de ratón, 2 ng de *lef1* de ratón y 300 ng de DNAs del plásmido pSuper. Tres días después de la transfección, se añadió medio acondicionado Wnt3a de ratón o medio que contenía LiCl 30 mM para estimular la señalización Wnt. 24 horas más tarde, se determinó la actividad de luciferasa utilizando el sistema de luciferasa Dual (Promega).

(C) Embriones, explantes, hibridación in situ y síntesis de RNA

Se realizaron fertilización *in vitro*, cultivo de embriones, estadificación, microinyección y cultivo de explantes de embriones de *Xenopus* como ha sido descrito (Gawantka et al., *EMBO J.* 14 (1995), 6268-79). Se llevó a cabo una hibridación in situ con marcación doble y simple del montaje entero de acuerdo con (Bradley et al., *Development* 122 (1996), 2739-50). Se utilizó un fragmento PCR de cDNA de *Rspo3 tropicalis* para la hibridación in situ en embriones de *Xenopus laevis*. Para el seccionamiento con vibratomo, se pusieron los embriones en medio de incrustación (0,4% de gelatina, 30% de albúmina, 20% de sacarosa en PBS) y se montaron en presencia de 2% de aldehído glutárico. El seccionamiento se llevó a cabo utilizando un vibratomo VT100E (Leica). Los cerebros de embriones de *Xenopus* de 4 días se cortaron en solución 1 x Barth y se fijaron para hibridación in situ. La elección in situ del montaje entero de los embriones de ratón se realizó de acuerdo con procedimientos descritos anteriormente (Koop et al., *Mech. Dev.* 59 (1996), 73-78). La preparación de mRNA para las inyecciones de *Xenopus* se llevó a cabo utilizando el kit de transcripción in vitro MegaScript (Ambion), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

(D) Morfolino-oligonucleótidos antisentido y constructos de siRNA

La secuencia de nucleótidos 5' de un (pseudo)-alelo adicional para el gen *Rspo2* de *Xenopus* se obtuvo utilizando RACE 5' (kit GeneRacer, Invitrogen). Basándose en estas secuencias, se diseñó un morfolino-oligonucleótido antisentido que direccionaba ambos pseudoalelos alrededor del codón inicial ATG (*Rspo2Mo*): GCCGTCCAAATGCAGTTTCAAC. Se produjeron constructos PSuper que producían siRNA contra *Rspo2,3* humano o un control sin sentido de acuerdo con Brummelkamp et al., Science 296 (2002), 550-3. Las secuencias son: *Rspo2* humano, TCCCATTTGCAAGGGTTGT; *Rspo3* humano, AGCTGACTGTGATACCTGT; control sin sentido, ACTACCGTTGTTATAGGTG.

(E) Inmunohistoquímica, transferencia Western y análisis por transferencia de mancha

La inmunohistoquímica para detectar β -catenina en células SHEP se llevó a cabo de acuerdo con (Scheiffele et al., J. Cell. Biol. 140 (1998), 795-806) utilizando anticuerpos anti- β -catenina (Transduction Laboratories, Newington). Para la detección de las proteínas *Rspo* marcadas o controles de carga en la transferencia Western, se utilizaron anticuerpos anti-Myc (clon 9E10), anticuerpos monoclonales anti-FLAG (M2, SIGMA), anti-GFP de pollo (Chemicon, Hampshire) y anti- α -tubulina de ratón (SIGMA). La detección por quimioluminiscencia (solución SuperSignal®, Pierce) se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante después de incubación de las transferencias con IgG-HRP anti-ratón (Pierce). Para el análisis de la expresión de *Rspo* en muestras de tumores se utilizó el sistema Cáncer Profiling Array II (Clontech, Palo Alto) y la hibridación se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

(F) RT-PCR

Los ensayos RT-PCR se llevaron a cabo como ha sido descrito (Dosch et al., Development 124 (1997), 2325-34; Glinka et al., Nature 389 (1997), 517-519); cebadores adicionales fueron: *Rspo2* de *Xenopus* (directo, GAATGCCAGAAAGGATTTGC; inverso, GGGATGGTGTCTTTTGCTGG); *Rspo3* de *Xenopus* (directo, GAAGCAAATTGGAGTCTGTCTG; inverso, GATTGTTCTCAAACCCTTCAGG); *Rspo1* humano (directo, ACAGACACAAGACACACACGC; inverso, TGTCTTCTGGTGGCCTCAG); *Rspo2* humano (directo, CCGAGCCCAGATATGAAC; inverso, TGACCAACTTCACATCCTTCC); *Rspo3* humano (directo, AGGGACTGAAACACGGGTC; inverso, TGTCTTCTGGTGGCCTCAG); *Rspo4* humano (directo, AAGCTGGGACACAGCACAG; inverso, GAAGCCTTGGAGCCTT GTC).

Ejemplo Comparativo 2

Aislamiento de un cDNA codificante de Futrina 1 de *Xenopus*

Se utilizó un banco de cDNA de ojos adultos de *Xenopus* en el vector de expresión pCS2+ para preparar agrupaciones de aproximadamente 250 colonias, y el DNA plasmídico de cada agrupación se transfectó transitoriamente en células 293T junto con el receptor de Wnt frizzled8, el informador de Wnt TOP-FLASH (Korinek et al., Science 275 (1997), 1784-1787) y luciferasa de Renilla para normalización, en placas de 96 pocillos utilizando FuGENE6 (Roche, Basilea). Después de 24 horas, se determinó la actividad relativa de luciferasa. Se identificó una agrupación que producía una señal por encima del ruido de fondo (Figuras 1 y 2A) y se aisló un gen que albergaba esta actividad a partir de la agrupación por selección de consanguinidad. El análisis de la secuenciación demostró que el mismo representa futrina 1 de *Xenopus*. Las búsquedas en bases de datos revelaron cuatro genes estrechamente afines en humanos, denominados hfutrina 1, 2, 3 y 4 (Figuras 3 y 4 ó 6a).

Se predice que la futrina 1 de *Xenopus* (*Rspo2*) codifica una proteína secretada con 243 aminoácidos (proteína madura) y un punto isoeléctrico de 9,8. Todas las R-espondinas contienen un péptido señal N-terminal (SP), dos dominios semejantes a furina (FU), un dominio de tromboespondina tipo 1 (TSP1) y una región C-terminal de baja complejidad enriquecida con aminoácidos cargados positivamente (C) (Figura 2F). El dominio rico en cisteína semejante a furina se encuentra, v.g., en endoproteasas semejantes a furina, el receptor EGF y el receptor de insulina. En la transducción de señales por ciertas tirosina-quinasas receptoras son necesarias repeticiones de furina para la agregación del receptor. Repeticiones de TSP1 se encuentran en tromboespondina y otras proteínas de la matriz extracelular como Mindina, F-espondina, SCO-espondina, así como en un cierto número de proteínas implicadas en la cascada del complemento. Proteínas que contienen repeticiones TSP1 están implicadas en la interacción célula-célula, la inhibición de la angiogénesis y la apoptosis (Adams y Tucker, Dev. Dyn. 218 (2000), 280-99).

Si bien el *Rspo2* de *Xenopus* contiene un péptido señal N-terminal predicho, la proteína secretada es casi indetectable en el medio de células 293T transfectadas transitoriamente. Dado que el extremo C está enriquecido con aminoácidos de carácter básico, lo cual promueve la retención en la superficie celular, se testó una proteína truncada C-terminalmente. *Rspo2 Δ C* se secreta eficazmente en el medio a partir de las células 293T (Figura 2B) y es funcionalmente activo (Figura 2F). Dado que todas las R-espondinas comparten el extremo C de carácter básico y dado que no existen señales de retención evidentes en ER o Golgi, esto sugiere que las proteínas están asociadas normalmente con la superficie celular.

Ejemplo 3

Las Futrinas promueven la señalización Wnt

Futrina 1 de *Xenopus* y las Futrinas 1, 2 y 3 humanas son capaces de estimular la expresión de informadores sensibles a Wnt en células HEK 293T cuando se proporcionan por transfección transitoria (Figuras 2C y 5A). Adicionalmente, las mismas son capaces de aumentar la expresión de informadores inducida por Wnt (Wnt1/3A de ratón) sinérgicamente (Figuras 2D y 5B). Experimentos de cotransfección en células HEK 293T se llevaron a cabo con los genes indicados y en el informador de Wnt TOP-FLASH (Korinek et al. Science 275 (1997) 1784-1787) y luciferaza de Renilla para la normalización, en placas de 96 pocillos utilizando FuGENE 6 (Roche). Después de 24 horas, se determinó la actividad relativa de luciferasa.

Todos los miembros testados de la familia Rspo (v.g. *Rspo1-3* murino, *Rspo2*, 3 humano) exhiben efectos equivalentes (Figura 6A y datos no presentados). La señalización de Rspo2 es sensible a los inhibidores del camino Wnt/ β -catenina dominantes negativos TCF y *dickkopf1* (Figura 6B). Se observa un efecto de señalización sinérgico cuando *Rspo2* se somete a cotransfección con componentes extracelulares, pero no con componentes intracelulares del camino Wnt/ β -catenina (Figura 6C). La máxima cooperación se observa de manera reproducible entre Rspo2 y Wnts, ya sea utilizando medios acondicionados (Figura 2D) o después de co-transfección (Figura 6C).

Un sello de activación de la señalización Wnt/ β -catenina es la acumulación citosólica de β -catenina debido a su estabilización. El tratamiento de células 293T con medio acondicionado Wnt3a induce β -catenina citosólica después de 1 hora y si bien el Rspo2 Δ C recombinante no es capaz por sí solo de estabilizar la β -catenina durante este intervalo, el mismo aumenta fuertemente la actividad de Wnt3a para hacerlo (Figura 2E, arriba). Después de 4 horas de tratamiento, ambos medios acondicionados Wnt3a y Rspo2 Δ C son capaces de inducir la acumulación de β -catenina a niveles similares (figura 2E, arriba). Es sabido que β -catenina penetra en los núcleos en respuesta a la estimulación de Wnt y activa la expresión génica junto con los factores de transcripción Lef/Tcf. El tratamiento de células SHEP por medios acondicionados Wnt3a o Rspo2 Δ C induce débilmente la localización nuclear de β -catenina, mientras que el co-tratamiento con Wnt3a y Rspo2 Δ C aumenta fuertemente la acumulación de nucleasas (Figura 2E, abajo). Puede llegarse a la conclusión de que las R-espondinas representan una nueva familia de proteínas secretadas capaces de promover la señalización Wnt/ β -catenina.

Para estudiar funcionalmente sus dominios de señalización, se crearon deleciones seriadas de Rspo2 de *Xenopus* (Figura 2F). Como se ha expuesto, el extremo C de carácter básico puede eliminarse sin pérdida de actividad, y esto sucede también para el dominio TSP1 (Figura 2F). Sin embargo, los dominios semejantes a furina son necesarios para la señalización Wnt/ β -catenina, dado que la deleción de cualquiera de los dominios furina 1 ó 2 anula la actividad en los ensayos informadores (Figura 2F).

Ejemplo 4

Las futrinas son necesarias para la señalización Wnt completa

Para testar el requerimiento de Futrinas en la señalización de Wnt, se utilizó la inactivación de genes mediada por siRNA (Brummelkamp et al., Science, 2002, 296 (5567): 550-3). Se transfectaron células HeLa utilizando Lipofectamine Plus con 80 ng del informador de Wnt 7LEF-Rev-fosLuc, 10 ng de pRL-TK (Promega) y 300 ng de constructos pSuper (Brummelkamp et al.) que producen siRNA contra Futrina 1 y 2 humana o un control sin sentido. El constructo de informador 7LEF-Rev-fosLuc que contenía siete sitios de fijación LEF frente al promotor fos mínimo seguido por el ORF de luciferasa de luciérnaga fue proporcionado amablemente por R. Grosschedl (Howard Hughes Medical Institute). Los constructos pSuper contienen secuencias de 19 nucleótidos de Futrina 1 humana (secuencia: TCCCATTGCAAGGGTTGT), Futrina2 humana (secuencia: AGCTGACTGTGATACCTGT) o secuencia de control sin sentido (ACTACCGTTGTTATAGGTG).

Un día después de la transfección se cambió el medio de FCS al 10% a FCS al 0,5%. Tres días después de la transfección se añadió al cultivo medio acondicionado de ratón Wnt3A o medio de control de células 293 para estimular la señalización Wnt. 24 horas más tarde, se determinó la actividad de luciferasa. Como se muestra en la Figura 7, las células HeLa exhiben niveles reducidos de Futrina 1 y 2, y la señalización Wnt disminuyó al 50%, lo que indicaba que las Futrinas son necesarias para la señalización Wnt completa. Este efecto puede ser rescatado eficientemente por 5 ng de Futrina 1 recombinante de ratón, lo que confirma su especificidad. Los datos están normalizados para actividad de luciferasa de Renilla.

Ejemplo 5

Expresión de genes de R-espondina en embriones de *Xenopus* y ratón

En los embriones de *Xenopus* no se detecta RNA materno alguno de *Rspo2* por RT-PCR. Su expresión cigótica comienza en la etapa precoz de la gástrula y se mantiene constante a lo largo de la neurulación y organogénesis (Figura 8A). Por hibridación in situ del montaje entero, se observa una expresión débil de *Rspo2* en todo el ectodermo de las gástrulas precoces (no representado). Durante la gastrulación se detecta una expresión fuerte en la zona marginal tanto en el casquillo profundo como en las superficiales, pero se excluye del organizador Spemann (Figura 8B). En la etapa final de la gástrula, la expresión de *Rspo2* persiste en el mesodermo de la placa lateral y se hace detectable en la placa neural anterior (Figura 8C). En la etapa 15, se observa la expresión en dos franjas longitudinales a lo largo de la placa neural (futura placa de techo), en la placa neural anterior y en el mesodermo

lateral y posterior (Figura 8D). La expresión de *Rspo2* en la etapa del primordio de la cola (Figura 8F) está restringida a varias regiones del cerebro, que incluyen el diencéfalo y la zona límite cerebro medio-cerebro posterior, el pronefros y el tubo neural dorsal. Se detecta también expresión en las porciones dorsal y más ventral de los somitos, la aleta dorsal y el proctodeum. La expresión de *Rspo2* en el cerebro de los renacuajos tardíos está restringida principalmente al diencéfalo, con inclusión de la zona intratálamica limitante (zli) (Figura 8H).

La expresión de *Rspo3* de *Xenopus* está relacionada con la de *Rspo2*. La misma se detecta primeramente en la etapa gastrular (no representada) y en las néurulas se expresa en el borde anterior de la placa neural y el mesodermo posterior (Figura 8E). En la etapa del primordio de la cola, se coexpresa con *Rspo2* en el sistema nervioso central pero exhibe una expresión adicional en los arcos branquiales y el primordio de la cola (Figura 8G).

En el ratón, los transcritos de *Rspo3* se detectan por hibridación in situ el día 7,5 en la línea primitiva (Figura 8J) mientras que la expresión de *Rspo1* y 2 no es detectable. El día 9,5, *Rspo1-3* exhiben expresión diferencial en diversos derivados neurales y mesodérmicos (Figura 8K-M), principalmente a lo largo del tubo neural dorsal (*Rspo1* y 3), el diencéfalo (*Rspo1*, 2, 3), los somitos (*Rspo3*) y el mesodermo del primordio de la cola (*Rspo3*). En los primordios de los miembros, los tres genes exhiben expresión diferencial prominente (Figura 8I), en particular en la región morfológicamente activa tal como el reborde apical ectodérmico (AER) (*Rspo2*).

Ejemplo 6

Las R-espondinas se co-expresan con y son reguladas por Wnts

Las R-espondinas no sólo exhiben una interacción funcional con la señalización Wnt, sino también una co-expresión con los genes *Wnt* en muchas regiones durante el desarrollo embrionario de *Xenopus* y de ratón. En el mesodermo gastrular, tanto de *Xenopus* como de ratón, *Rspo2* y 3 se co-expresan con *XWnt8* y *mWnt3*, respectivamente. Análogamente, en etapas posteriores, los miembros de la familia R-espondina se co-expresan ampliamente con cierto número de genes *Wnt*, v.g. en el límite cerebro medio-cerebro posterior, el tubo neural dorsal, el primordio de los miembros y el primordio de la cola. Una comparación directa entre los patrones de expresión de *Rspo2* de *Xenopus* y *Wnt8* y *Wnt3a* exhibe un gran solapamiento (Figura 9A).

De hecho, los Wnts son capaces de inducir la expresión de *Rspo*, dado que embriones de *Xenopus* inyectados con DNA de pCS-*Wnt8* o pCS- β -catenina regulan en sentido creciente tanto *Rspo2* como *Rspo3* por RT-PCR (Figura 9B). Análogamente, los embriones inyectados con DNA de pCS-*Wnt8* o pCS-*Wnt3a* exhiben expresión ectópica de *Rspo2* por hibridación in situ (Figuras 8C-E). Los resultados indican que la co-expresión observada es debida a la regulación de las R-espondinas por los *Wnts*. Esto es consistente con la observación de que la expresión de *Rspo1* es reducida en el cordón medular dorsal de los embriones de ratón silenciados *Wnt1* o *Wnt3a*.

Ejemplo Comparativo 7

Futrina 1 (R-espondina 2) activa los marcadores neurales y regula (promueve) la formación de músculo

El análisis de la pérdida de función en embriones de *Xenopus* demuestra que se requiere Futrina 1 para la formación de músculo. Inyecciones de oligomorfolino antisentido contra Futrina 1 (Fut1-Mo) causan regulación decreciente de los marcadores precoces de músculo MyoD y Myf5 e inducen defectos musculares (Figura 10A). La especificidad de este efecto fue documentada en primer lugar por la capacidad de Fut1-Mo para inhibir la traducción del constructo de DNA cognado cuando se sobre-expresaba en embriones (Figura 10B) y, en segundo lugar, por la capacidad del mRNA de *Xfut1* para rescatar el efecto de Fut1-Mo (Figura 10C).

Cuando el camino Wnt/ β -catenina se sobreactiva en embriones de *Xenopus*, se observan una diversidad de respuestas: i) la inyección de mRNA de activadores del camino induce típicamente los ejes embrionarios secundarios en los embriones enteros y los marcadores neurales anteriores en el casquillo animal y los embriones enteros; ii) la inyección de DNA de activadores del camino que impulsan la expresión después de MBT, posterioriza el sistema nervioso central (CNS). Para testar si *Rspo2* es capaz de mimetizar cualquiera de estos efectos, se microinyectó mRNA sintético en embriones de *Xenopus*. No obstante, la inyección de mRNA de *Rspo2* no induce los ejes secundarios en los embriones enteros y la inyección de DNA de pCS-*Rspo2* no posterioriza el CNS, dado que las cabezas son de tamaño normal, la expresión de *Otx2* se expande y *en2* no se ve afectado (Figura 11D, H).

En el casquillo animal, *Rspo2* induce los marcadores pan-neurales *NCAM* y *N-tubulina* y el marcador neural anterior, *Otx2*, como lo hacen *XWnt8* y β -catenina (Figura 11A). Análogamente, en los embriones enteros inyectados con mRNA de *Rspo2*, se observan glándulas de cemento ectópicas y expansión lateral de la placa neural en el lado inyectado, como se muestra por la expresión de los marcadores neurales *Sox3*, *Otx2*, *not2*, *en2* y *Rx1* (Figuras 11 B-H). La expresión ectópica de *Otx2* se observa ya en los embriones de la etapa gastrular (Figura 11I+J). Estos resultados son consistentes con la capacidad de la señalización Wnt/ β -catenina para bloquear la expresión de BMP4 y activar con ello el desarrollo neural.

Para analizar ulteriormente el efecto de la sobre-expresión de mRNA de *Rspo2* y la señalización por BMP4, Activina, Nodal y FGF, se llevaron a cabo ensayos del casquillo animal y se testaron respecto a la inducción de genes diana por señales de tres factores de crecimiento (Figura 12). *Rspo2* bloquea como era de esperar la

expresión de *Xvent2* mediada por BMP4, pero inhibe también sorprendentemente la inducción de *Xbra* mediada por Activina y Nodal (Figuras 12A-C). Esto es contrario a las inyecciones de mRNA de *XWnt8* y β -catenina, que no afectan a la inducción de *Xbra* por Activina (Figura 12B). En contraste con la señalización por tres factores de crecimiento del tipo TGF- β , la expresión de *Xbra* inducida por FGF8 no se ve afectada por el *Rspo2* sobre-expresado (Figura 12D). Puede llegarse a la conclusión de que la sobre-expresión de *Rspo2*, además de activar el camino Wnt/ β -catenina es capaz también de interferir con la señalización por tres factores de crecimiento de la familia TGF- β .

Otro efecto bien conocido de la señalización cigótica Wnt/ β -catenina es su capacidad para promover la miogénesis. Por ejemplo, *XWnt8* puede inducir la formación de músculo en las células mesodérmicas ventrales. Cuando las zonas ventrales marginales (VMZs) de embriones inyectados con *Rspo2* se disecan y se cultivan hasta la etapa 40, se alargan, forman estructuras semejantes a colas, y son contráctiles. Este fenotipo es indistinguible de los explantes de zona marginal lateral (LMZs) de control, que diferencian típicamente el músculo (Fig. 4 K-L). La hibridación in situ confirmó la inducción de *actina* muscular en VMZs inyectadas tanto con *Wnt8* como con *Rspo2*, pero no en las VMZs de control (inyectadas con preprolactina) (Figura 11M). Dado que las *R-espondinas* son capaces de aumentar la señalización Wnt en células 293T, se testó su cooperación en la miogénesis de *Xenopus*. *Myf5* es un marcador miogénico expresado característicamente en el mesodermo lateral. No obstante, el mismo está excluido del mesodermo dorsal, y los explantes de zona dorsal marginal (DMZ) expresan solamente una pequeña cantidad de *myf5* como se determina por RT-PCR (Figura 11N). En los DMZs de embriones inyectados con constructos de DNA que dirigen la expresión posterior de MBT, *myf5* es débilmente inducido por *Rspo2*, moderadamente por *Wnt8* y fuertemente por su combinación (Figura 11N, arriba). El efecto promotor de la miogénesis de *Rspo2* es reprimido por los dominantes negativos *dishevelled* (*Xdd1*), *dkk1* y GSK-3 β , que bloquean todos ellos la señalización Wnt (Figura 11N, abajo). En resumen, los resultados sugieren que *Rspo2* puede promover la miogénesis por la vía del camino Wnt/ β -catenina.

Ejemplo Comparativo

25 Se requiere *R-espondina2* para la miogénesis mediada por Wnt/ β -catenina

Para investigar el papel fisiológico de *Rspo2* durante la embriogénesis de *Xenopus*, se inyectaron morfolino-oligonucleótidos antisentido (*Rspo2*Mo). La capacidad de *Rspo2*Mo para bloquear la producción de la proteína *Rspo2* se demuestra por transferencia Western (Figura 13A). La inyección de este morfolino en un blastómero dorso-animal en la etapa de ocho células da como resultado defectos en los ojos, aunque la expresión de marcadores precoces de ojo (*Rx1*, *Pax6*), neurales anteriores (*Otx2*) y pan-neurales (*Sox3*) no se ve afectada obviamente (no representado).

La inyección ecuatorial de *Rspo2*Mo en un blastómero en la etapa de ocho células conduce a defectos musculares en el lado inyectado (Figura 13B). La hibridación in situ para *actina* muscular y las secciones transversales de tronco demuestran que la inyección de *Rspo2*Mo causa somitos desorganizados (paneles a-b) y miotomos reducidos (paneles c-d). Los experimentos de seguimiento del linaje demostraron que las células inyectadas con *Rspo2*Mo contribuyen al mesodermo de la placa lateral en lugar de somitos o sufren una muerte celular (datos no mostrados). En la etapa gastrular, la expresión de los marcadores miogénicos *myf5* y *myoD* se ve fuertemente regulada en sentido decreciente en el lado inyectado con *Rspo2*Mo (paneles e-h), mientras que el marcador pan-mesodérmico *Xhra* y el marcador organizador *Xnot2* no se ven afectados (paneles i-i).

Para testar la especificidad de *Rspo2*Mo, se realizaron experimentos de rescate por co-inyección de *Rspo2*Mo junto con un RNA de *Rspo2*, en el cual seis nucleótidos no codificantes estaban mutados de tal modo que el mismo no podría ser direccionado por este morfolino. La expresión de *myf5* (Figura 13C) y *myoD* (datos no mostrados) es rescatada eficazmente por este RNA mutante de *Rspo2*, lo que indica que el efecto de *Rspo2*Mo en la miogénesis es específico.

Se utilizó *Rspo2*Mo como herramienta para examinar la posición epistática de *Rspo* en el camino Wnt/ β -catenina. Como indicador de la señalización para Wnt/ β -catenina, se utilizó la expresión de *myf5* y *actina muscular* en explantes de la zona marginal (Figura 13D). En los explantes DMZ y VMZ, el DNA de *Wnt8* induce *myf5* y *actina muscular*, y esta inducción es bloqueada significativamente por *Rspo2*Mo (Figura 13D, paneles a-b, pistas 3-4). Sin embargo, la inducción de *myf5* y *actina muscular* por los activadores intracelulares del camino Wnt como *dishevelled*, dnGSK-3 β y β -catenina no se ve afectada por *Rspo2*Mo (a-b, pistas 5-10). En los explantes LMZ, la inyección de *Rspo2*Mo regula decrecientemente la expresión endógena de *myf5* y *actina muscular* (Figura 13B, paneles c-d, pistas 1-2). En las co-inyecciones de DNA, este efecto es rescatado eficazmente por β -catenina, pero sólo débilmente por *XWnt8* (pistas 3-6). El efecto residual de *xWnt8* es debido probablemente a su acción no autónoma de las células y las células que no recibieron *Rspo2*Mo. Considerados en su conjunto, estos resultados indican que *Rspo2* afecta al camino Wnt/ β -catenina al nivel o aguas arriba de *dishevelled*.

55 Ejemplo 9

Las *R-espondinas* son necesarias para la señalización Wnt/ β -catenina en células HeLa

A continuación, se testó el requerimiento de *Rspo2* para la señalización Wnt en células de mamífero utilizando

siRNA. Dado que existen cuatro R-espondinas con función aparentemente redundante, se seleccionaron células HeLa, que expresan únicamente *Rspo3* y muy débilmente *Rspo2* (Figura 14A). Diversas otras líneas de células, tales como células 293T, expresan los cuatro genes, complicando un enfoque de siRNA.

5 El silenciamiento de genes mediado por siRNA se llevó a cabo por transfección de constructos pSUPER (Brummelkamp et al., Science 296 (2002), 3286-3305) para producir siRNAs direccionados contra *Rspo2* y -3 (siRNA *Rspo2,3*). Como control, se utilizó un siRNA sin sentido. Para testar la eficiencia del siRNA, *Rspo3* humano marcado con FLAG se co-transfectó con siRNAs, y su producción fue reprimida por *Rspo3* de siRNA, pero no por el *Rspo2* de siRNA (Figura 14B).

10 En los ensayos del informador Wnt, los dos *Rspo2* y -3 de siRNA disminuían la actividad de luciferasa inducida por Wnt3a comparados con el siRNA de control (Figura 14C). Cuando se co-transfectan *Rspo2* y -3 de siRNA, la actividad del informador disminuye al 40%. Este efecto es específico, dado que la señalización Wnt reducida puede ser rescatada por el *Rspo2* co-transfectado de ratón, que no es direccionado por siRNAs contra las *R-espondinas* humanas (Figura 14C). Adicionalmente, al contrario que la actividad del informador inducida por Wnt3a, *Rspo2* + 3 de siRNA no afectan a la señalización Wnt/ β -catenina inducida por Li^+ (Figura 14D). Dado que Li^+ actúa por
15 inhibición de la actividad de GSK3 β , esto es de nuevo consistente con la acción de *Rspo2* al nivel o aguas arriba de *dishevelled*, llegándose a la conclusión de que en las células HeLa son necesarias las R-espondinas para la señalización total Wnt/ β -catenina.

Ejemplo 10

La expresión de futrina está desregulada en los tumores humanos

20 La regulación incorrecta de la señalización Wnt/ β -catenina está implicada en la tumorigénesis, v.g., cáncer de colon, cáncer de mama y melanoma (Barker et al., 2000; Bienz y Clevers, 2000; Polakis, 2000). Dado que las *R-espondinas* (futrinas) promueven la señalización Wnt/ β -catenina, las mismas pueden jugar también un papel en la tumorigénesis. Así, la expresión de Futrina 1-4 en diversos tejidos humanos normales y cancerosos se estudió
25 utilizando hibridación radiactiva en el sistema Clontech Cancer Profiling Array II. Se utilizó para la normalización la hibridación con la sonda ubiquitina. Los resultados demuestran que la expresión de las Futrinas 1-3 está desregulada drásticamente en los tejidos cancerosos humanos (Figura 15). En la mayoría de los tumores, la expresión de Futrinas 1-3 está desregulada drásticamente (tumores de colon, estómago, pulmón, recto para Futrina 1, tumores de mama, ovario, vejiga, útero, cérvix y recto para Futrina 2, tumores de útero y cérvix para Futrina 3). En un pequeño número de casos, la expresión de Futrinas 1-3 está regulada en sentido creciente (un caso de tumor de
30 estómago para Futrinas 1 y 2, y tumor de ovario para Futrina 3). La Futrina 4 exhibe un nivel de expresión muy bajo en la mayoría de los tejidos estudiados, excepto en el ovario. Resultados adicionales se muestran en la Figura 16, indicando también que *HRspo1* está expresado débilmente en los órganos adultos. El mismo exhibe regulación creciente en los tumores de ovario de dos pacientes y en una sola muestra de tumor de estómago. *HRspo2* se expresa en órganos de origen endodérmico, con inclusión de colon, recto, intestino delgado y pulmón. Su expresión
35 disminuía en las muestras de tumor correspondientes. *HRspo3* se expresa ampliamente y disminuye en muchas muestras de tumor. En general, la expresión de hRspo1-3 está desregulada en numerosos tumores, mientras que la expresión de hRspo4 es muy débil tanto en los órganos adultos como en los tumores humanos (datos no mostrados).

En lo que sigue se describen otros aspectos como parte de la memoria descriptiva:

40 1. Una composición de diagnóstico, que comprende:

- (a) al menos una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica Futrina 1, 2, 3 ó 4 según se representa en la Figura 3; y/o
- (b) al menos una molécula de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que codifica Futrina 1, 2, 3 ó 4 según se representa en la Figura 4 ó 6a ; y/o
- (c) al menos una molécula de ácido nucleico, cuya hebra complementaria se hibrida a una molécula de ácido nucleico de (a) y que codifica un polipéptido con la actividad biológica de Futrina 1, 2, 3 ó 4; y/o
- (d) al menos un fragmento de (a), (b) o (c) que tiene la actividad biológica de Futrina 1, 2, 3 ó 4;

50 (e) al menos una molécula de ácido nucleico, cuya secuencia difiere de la secuencia de la molécula de ácido nucleico de (a), (c) o (d) debido a la degeneración del código genético, y/o

(f) al menos un ligando que es capaz de fijarse específicamente a la molécula de (a), (b), (c), (d) o (e).

2. La composición de diagnóstico del objeto 1, en donde el ligando es un anticuerpo.
- 5 3. La composición de diagnóstico del objeto 1, en donde la molécula de ácido nucleico de la parte (d) tiene una longitud de al menos 10 nucleótidos.
4. La composición de diagnóstico de los objetos 1 ó 2, en donde el ligando está marcado de manera detectable.
5. La composición de diagnóstico del objeto 4, en donde el marcador se selecciona del grupo que consiste en un radioisótopo, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto fluorescente, un quelato de metal o una enzima.
- 10 6. La composición de diagnóstico de uno cualquiera de los objetos 1 a 3, en donde la molécula de ácido nucleico, el polipéptido o el ligando están fijados a un soporte sólido.
7. Uso de una molécula de ácido nucleico, polipéptido y/o ligando para la preparación de una composición de diagnóstico según se define en cualquiera de los objetos 1 a 6, para la diagnosis de una enfermedad asociada con (a) la expresión aberrante de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 y/o (b) las actividades o cantidades aberrantes de un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4.
- 15 8. Uso de acuerdo con el objeto 7, en donde la diana a la que se hibrida la molécula de ácido nucleico es un mRNA.
9. Un método de diagnosis de una enfermedad asociada con (a) la expresión aberrante de Futrina 1, 2, 3 ó 4 y/o (b) actividades o cantidades aberrantes de un polipéptido de Futrina 1, 2, 3, ó 4 en un individuo, que comprende:
- 20 (a) determinar (a) la cantidad de expresión de Futrina 1, 2, 3 ó 4 y/o (b) la cantidad de polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 biológicamente activo en una muestra biológica; y
- (b) diagnosticar una enfermedad asociada con (a) la expresión aberrante de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 y/o (b) actividades o cantidades aberrantes de un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 o un riesgo para el desarrollo de dicha enfermedad basado en una cantidad de expresión alterada de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 y/o (b) una cantidad alterada de polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 biológicamente activo comparadas con un control.
- 25 10. Un método para identificar una pareja de fijación a un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4, que comprende:
- (a) poner en contacto dicho polipéptido con un compuesto a cribar; y
- (b) determinar si el compuesto efectúa una actividad de dicho polipéptido o si se ha producido la fijación del compuesto a dicho polipéptido.
- 30 11. Un método de identificación de activadores/agonistas o inhibidores/antagonistas de un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4, que comprende los pasos de:
- (a) incubar un compuesto candidato con dicho polipéptido;
- (b) ensayar una actividad biológica, y
- (c) determinar si se ha alterado una actividad biológica de dicho polipéptido.
- 35 12. Un método de identificación y obtención de un fármaco candidato para la terapia de una enfermedad asociada con (a) una expresión aberrante del gen que codifica Futrina 1, 2, 3 y/o 4 y/o (b) actividades o cantidades aberrantes de Futrina 1, 2, 3 y/o 4, que comprende los pasos de:
- 40 (a) poner en contacto un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 o una célula que expresa dicho polipéptido, y opcionalmente el o los ligandos correspondientes, en presencia de componentes capaces de proporcionar una señal detectable en respuesta a la fijación a dicho fármaco candidato a cribar; y
- (b) detectar la presencia o ausencia de una señal o el aumento de la señal generada, en donde la presencia o aumento de la señal es indicativa de un fármaco supuesto.
13. Un activador/agonista o inhibidor/antagonista de un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 o pareja de fijación de dicho o dichos polipéptidos, obtenible mediante el método de uno cualquiera de los objetos 10 a 12.
- 45 14. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto que es capaz de modular la expresión de un gen que codifica Futrina 1, 2, 3 y/o 4 o la actividad de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 y un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

15. La composición farmacéutica del objeto 14, en donde el compuesto estimula la expresión del gen que codifica Futrina 1, 2, 3 y/o 4 o la actividad de Futrina 1, 2, 3 y/o 4.

5 16. La composición farmacéutica del objeto 15, en donde el compuesto es una molécula de nucleótido que codifica un polipéptido que tiene una actividad biológica de Futrina 1, 2, 3 y/o 4, un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4, un activador/agonista o inhibidor/antagonista de un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 o pareja de fijación de dicho o dichos polipéptidos, obtenible mediante el método de uno cualquiera de los objetos 10 a 12.

10 17. Uso de un compuesto según se define en el objeto 16, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad asociada con (a) la expresión aberrante de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 y/o un gen implicado en la cascada de señales de Wnt y/o (b) actividades o cantidades aberrantes de una Futrina 1, 2, 3 y/o 4 y/o un polipéptido implicado en la cascada de señales de Wnt.

18. Uso de acuerdo con los objetos 7 ó 17, en donde la enfermedad es un tumor o una enfermedad de los riñones, músculo, huesos y ojos.

15 19. Uso de una molécula de nucleótido que codifica un polipéptido que tiene una actividad biológica de Futrina 1, 2, 3 y/o 4, un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4, un activador/agonista de un polipéptido de Futrina 1, 2, 3 y/o 4 o pareja de fijación de dicho o dichos polipéptidos, para la preparación de una composición farmacéutica para activar o inhibir la cascada de señales de Wnt.

20. Uso de acuerdo con el objeto 19 para soportar procesos regenerativos.

LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts Niehrs, christof Wu, Wei Glinka, Andrei Kazanskay, Olga

<120> Composiciones para diagnosis y terapia de enfermedades asociadas con la expresión aberrante de Futrinas (R-espondinas)

<130> K 3195

<140> PCT/EP 2004/011269

25 <141> 08-10-2004

<150> EP 03 023 000.7

<151> 10-10-2003

30 <160> 32

<170> PatentIn version3.2

<210> 1

35 <211> 22

<212> DNA

<213> artificial

<220>

40 <223> oligonucleótido Rspo2Mo

<400> 1

gccgtccaaa tgcagttca ac 22

<210> 2

<211> 19

5 <212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido Rspo2 humano antisentido

10 <400> 2

tccatttgc aagggttg 19

<210> 3

<211> 19

15 <212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido Rspo3 antisentido

20 <400> 3

agctgactgt gatacctg 19

<210> 4

25 <211> 19

<212> DNA

<213> artificial

<220>

30 <223> oligonucleótido control sin sentido

<400> 4

actaccgtg ttataggtg 19

35 <210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220>

5 <223> Rspo2 cebador directo

<400> 5

gaatgcccag aaggattgc 20

10 <210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

15 <220>

<223> Rspo2 cebador inverso

<400> 6

gggatggtgt ctttgctgg 20

20

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

25

<220>

<223> Rspo3 cebador directo

<400> 7

30 gaagcaaatt ggagtctgc g 21

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

35 <213> artificial

<220>

<223> Rspo3 cebador inverso

<400> 8

5 gattgtctc aaaccctca gg 22

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

10 <213> artificial

<220>

<223> Rspo1 cebador humano directo

15 <400> 9

acagacacaa gacacacag c 21

<210> 10

<211> 19

20 <212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Rspo1 cebador humano inverso

25

<400> 10

tgtctctgg tggcctcag 19

<210> 11

30 <211> 19

<212> DNA

<213> artificial

<220>

35 <223> Rspo2 cebador humano directo

ES 2 437 337 T3

<400> 11

ccgagcccca gatatgaac 19

<210> 12

5 <211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<220>

10 <223> Rspo2 cebador humano inverso

<400> 12

tgaccaactt cacatccttc c 21

15 <210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial

20 <220>

<223> Rspo3 cebador humano directo

<400> 13

agggactgaa acacgggtc 19

25

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial

30

<220>

<223> Rspo3 cebador humano inverso

<400> 14

35 tgtctctctgg tggcctcag 19

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial

5

<220>

<223> Rspo4 cebador humano directo

<400> 15

10 aagctgggac acagcacag 19

<210> 16 K3195.txt

<211> 19

<212> DNA

15 <213> artificial

<220>

<223> Rspo4 cebador humano inverso

20 <400> 16

gaagccttgg agccttgtc 19

<210> 17

<211> 19

25 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

tccatttgc aagggttgt 19

30

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

35

<400> 18

ES 2 437 337 T3

agctgactgt gataacctgt 19

<210> 19

<211> 19

5 <212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> secuencia sin sentido de constructo psuper

10

<400> 19

actaccgttg ttataggtg 19

<210> 20

15 <211> 843

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

atgctggcttg ggctgtgtgt ggtggccctg gttctgagct ggacgcacct caccatcagc 60
agccggggga tcaaggggaa aaggcagagg cggatcagtg ccgaggggag ccaggcctgt 120
gccaaaggct gtgagctctg ctctgaagtc aacggctgcc tcaagtgtc acccaagctg 180
ttcatcctgc tggagaggaa cgacatccgc caggtgggag tctgcttgcc gtcctgcca 240
cctggatact tcgacgcccg caacccccgac atgaacaagt gcatcaattc ctctgcagta 300
cctgcagctc taggccaggg tcctgccctc catgtagaat gcaagatcga gcactgtgag 360
gcctgcttca gccataactt ctgcaccaag tgtaaggagg gcttgtacct gcacaagggc 420
cgctgctatc cagcttgtcc cgagggctcc tcagctgcca atggcaccat ggagtgcagt 480
agtctgctc aatgtgaaat gagcagtggt tctccgtggg ggccctgctc caagaagcag 540
cagctctgtg gtttccggag gggctccgag gagcggacac gcaggggtgct acatgccctc 600

gtgggggacc atgctgcctg ctctgacacc aaggagacct ggaggtgcac agtgaggaga 660
gtgccgtgtc ctgaggggca gaagaggagg aaggagggcc agggccggcg ggagaatgcc 720
aacaggaacc tggccaggaa ggagagcaag gaggcgggtg ctggctctcg aagacgcaag 780
gggcagcaac agcagcagca gcaagggaca gtggggccac tcacatctgc agggcctgcc 840
tag 843

20

ES 2 437 337 T3

<210> 21

<211> 732

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 21

```

atgcagtttc gccttttctc ctttgcctc atcattctga actgcatgga ttacagccac      60
tgccaaggca accgatggag acgcagtaag cgagctagtt atgtatcaaa tcccatttgc      120
aagggttggt tgtcttggtc aaaggacaat ggggtgtagcc gatgtcaaca gaagttgttc      180
ttcttccttc gaagagaagg gatgcgccag tatggagagt gcctgcattc ctgcccattc      240
gggtactatg gacaccgagc cccagatatg aacagatgtg caagatgcag aatagaaaac      300
tgtgattctt gcttttagcaa agacttttgt accaagtgca aagtaggctt ttatttgcatt      360
agaggccggt gctttgatga atgtccagat ggttttgcac cattagaaga aaccatggaa      420
tgtgtggaag gatgtgaagt tggtcattgg agcgaatggg gaacttgtag cagaaataat      480
cgcacatgtg gatttaaatt gggctctggaa accagaacac ggcaaattgt taaaaagcca      540
gtgaaagaca caataccgtg tccaaccatt gctgaatcca ggagatgcaa gatgacaatg      600
aggcattgtc caggagggaa gagaacacca aaggcgaagg agaagaggaa caagaaaaag      660
aaaaggaagc tgatagaaag ggcccaggag caacacagcg tcttcctagc tacagacaga      720
gctaaccaat aa                                                                732

```

10 <210> 22

<211> 819

<212> DNA

<213> Homo sapiens

15 <400> 22

ES 2 437 337 T3

atgcacttgc gactgatttc ttggcttttt atcattttga actttatgga atacatcggc 60
 agccaaaacg cctccccggg aaggcgccag cgaagaatgc atcctaacgt tagtcaaggc 120
 tgccaaggag gctgtgcaac atgctcagat tacaatggat gtttgtcatg taagcccaga 180
 ctatTTTTTg ctctggaaaag aattggcatg aagcagattg gagtatgtct ctcttcatgt 240
 ccaagtggat attatggaac tcgatatcca gatataaata agtgtacaaa atgcaaagct 300
 gactgtgata cctgtttcaa caaaaatttc tgcacaaaat gtaaaagtgg attttactta 360
 caccttggaa agtgccttga caattgccca gaaggggttg aagccaacaa ccatactatg 420
 gagtgtgtca gtattgtgca ctgtgaggtc agtgaatgga atccttggag tccatgcacg 480
 aagaagggaa aaacatgtgg cttcaaaaga yggactgaaa cacgggtccg agaataata 540

 cagcatcctt cagcaaaggg taacctgtgt cccccaacaa atgagacaag aaagtgtaca 600
 gtgcaaagga agaagtgtca gaaggagaa cgaggaaaaa aaggaagga gaggaaga 660
 aaaaaaccta ataaaggaga aagtaaagaa gcaatacctg acagcaaaag tctggaatcc 720
 agcaaagaa tcccagagca acgagaaaac aacagcagc agaagaagcg aaaagtccaa 780
 gataaacaga aatcgggtatc agtcagcact gtacactag 819

<210> 23

<211> 672

5 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

atgcggggcg cactctgcct gctcctgctc gtcgcccacg ccgtggacat gctcgcctg 60
 aaccgaagga agaagcaagt gggcactggc ctggggggca actgcacagg ctgtatcadc 120
 tgctcagagg agaacggctg ttccacctgc cagcagaggc tcttctgtt catccgccg 180
 gaaggcatcc gccagtacgg caagtgcctg cacgactgtc ccctgggta cttcggcatc 240
 cgcgggcagg aggtcaacag gtgcaaaaaa tgtggggcca cttgtgagag ctgcttcagc 300
 caggacttct gcatccgggt caagaggcag ttttacttgt acaaggggaa gtgtctgccc 360
 acctgcccgc cgggcacttt ggcccaccag aacacacggg agtgccaggg ggagtgtgaa 420
 ctgggtccct ggggcggctg gagcccctgc acacacaatg gaaagacctg cggctcggct 480
 tggggcctgg agagccgggt acgagaggct ggccgggctg ggcattgagga ggcagccacc 540
 tgccaggtgc tttctgagtc aaggaaatgt cccatccaga ggcctgccc aggagagagg 600
 agccccggcc agaagaaggg caggaaggac cggcgcccac gcaaggacag gaagctggac 660
 cgcaggctgg ac 672

ES 2 437 337 T3

<210> 24
 <211> 732
 <212> DNA
 <213> Xenopus sp.

5

<400> 24

```

atgcagtttc aactcttttc attcgccctg atcatcctga actgtgtgga ttacagtcac      60
tgccaagcct cccgctggag acggagcaag agagccagct atgggaccaa cccgatatgc      120
aaaggttgcc tgtcctgctc aaaagataat gggcctcc gctgccagcc aaaactgttt      180
ttctttctgc gaagagaagg tatgaggcag tatggagagt gtctgcagtc ctgccctccg      240
ggatactatg gagtcagagg acctgatatg aacagggtgtt ccagatgcag aattgaaaat      300
tgcgactctt gttttagtag agatTTTTgc ataaagtgca aatcgggctt ttactccctc      360
aaggggcaat gctttgaaga atgccagaa ggatttgac cactggatga taccatggtg      420
tgtgtggatg gctgcgaagt agggccatgg agtgaatggg gcacatgcag ccgaaataac      480
agaacgtgcg gtttcaaatg gggcctggag accagaacgc gacaaattgt gaagaaacca      540
gcaaaagaca ccatcccctg cccaactatt gctgaatcca gaagatgtaa gatggcaata      600

agacactgcc ctggaggaaa gagaactaca aagaagaagg acaagaggaa caagaagaag      660
aaaaagaagt tactggagag ggccaagag cagcacagcg tcgtccttgc tacagaccgg      720
tctagccaat ag                                                    732
    
```

<210> 25
 <211> 262
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 25

Met Arg Leu Gly Leu Cys Val Val Ala Leu Val Leu Ser Trp Thr His
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile
 20 25 30
 Ser Ala Glu Gly Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser
 35 40 45
 Glu Val Asn Gly Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu
 50 55 60
 Glu Arg Asn Asp Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro
 65 70 75 80
 Pro Gly Tyr Phe Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Cys
 85 90 95
 Lys Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr Lys
 100 105 110
 Cys Lys Glu Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys
 115 120 125
 Pro Glu Gly Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser Pro
 130 135 140
 Ala Gln Cys Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser Lys
 145 150 155 160
 Lys Gln Gln Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg Thr Arg
 165 170 175
 Arg Val Leu His Ala Pro Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser Asp Thr
 180 185 190
 Lys Glu Thr Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg Val Pro Cys Pro Glu Gly
 195 200 205
 Gln Lys Arg Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg Arg Glu Asn Ala Asn Arg
 210 215 220
 Asn Leu Ala Arg Lys Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ala Gly Ser Arg Arg
 225 230 235 240
 Arg Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Thr Val Gly Pro Leu
 245 250 255
 Thr Ser Ala Gly Pro Ala
 260

<210> 26
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 26
 Met Gln Phe Arg Leu Phe Ser Phe Ala Leu Ile Ile Leu Asn Cys Met
 1 5 10 15
 Asp Tyr Ser His Cys Gln Gly Asn Arg Trp Arg Arg Ser Lys Arg Ala
 20 25 30
 Ser Tyr Val Ser Asn Pro Ile Cys Lys Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys
 35 40 45
 Asp Asn Gly Cys Ser Arg Cys Gln Gln Lys Leu Phe Phe Phe Leu Arg
 50 55 60
 Arg Glu Gly Met Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser
 65 70 75 80
 Gly Tyr Tyr Gly His Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys
 85 90 95
 Arg Ile Glu Asn Cys Asp Ser Cys Phe Ser Lys Asp Phe Cys Thr Lys
 100 105 110
 Cys Lys Val Gly Phe Tyr Leu His Arg Gly Arg Ser Phe Asp Glu Cys
 115 120 125
 Pro Asp Gly Phe Ala Pro Leu Glu Glu Thr Met Glu Cys Val Glu Gly
 130 135 140
 Cys Glu Val Gly His Trp Ser Glu Trp Gly Thr Cys Ser Arg Asn Asn
 145 150 155 160
 Arg Thr Cys Gly Phe Lys Trp Gly Leu Glu Thr Arg Thr Arg Gln Ile
 165 170 175
 Val Lys Lys Pro Val Lys Asp Thr Ile Pro Cys Pro Thr Ile Ala Glu
 180 185 190
 Ser Arg Arg Cys Lys Met Thr Met Arg His Cys Pro Gly Gly Lys Arg
 195 200 205
 Thr Pro Lys Ala Lys Glu Lys Arg Asn Lys Lys Lys Lys Arg Lys Leu
 210 215 220
 Ile Glu Arg Ala Gln Glu Gly His Ser Val Phe Leu Ala Thr Asp Arg
 225 230 235 240
 Ala Asn Gln

<210> 27
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 27
 Met His Leu Arg Leu Ile Ser Trp Leu Phe Ile Ile Leu Asn Phe Met
 1 5 10 15
 Glu Tyr Ile Gly Ser Gln Asn Ala Ser Arg Gly Arg Arg Gln Arg Arg
 20 25 30
 Met His Pro Asn Val Ser Gln Gly Cys Gln Gly Gly Cys Ala Thr Cys
 35 40 45
 Ser Asp Tyr Asn Gly Cys Leu Ser Cys Lys Pro Arg Leu Phe Phe Ala
 50 55 60
 Leu Glu Arg Ile Gly Met Lys Gln Ile Gly Val Cys Leu Ser Ser Cys
 65 70 75 80
 Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly Thr Arg Tyr Pro Asp Ile Asn Lys Cys Thr
 85 90 95
 Lys Cys Lys Ala Asp Cys Asp Thr Cys Phe Asn Lys Asn Phe Cys Thr
 100 105 110
 Lys Cys Lys Ser Gly Phe Tyr Leu His Leu Gly Lys Cys Leu Asp Asn
 115 120 125
 Cys Pro Glu Gly Leu Glu Ala Asn Asn His Thr Met Glu Cys Val Ser
 130 135 140
 Ile Val His Cys Glu Val Ser Glu Trp Asn Pro Trp Ser Pro Cys Thr
 145 150 155 160
 Lys Lys Gly Lys Thr Cys Gly Phe Lys Arg Gly Thr Glu Thr Arg Val
 165 170 175

10

Arg Glu Ile Ile Gln His Pro Ser Ala Lys Gly Asn Leu Cys Pro Pro
 180 185 190

Thr Asn Glu Thr Arg Lys Cys Thr Val Gln Arg Lys Lys Cys Gln Lys
 195 200 205

Gly Glu Arg Gly Lys Lys Gly Arg Glu Arg Lys Arg Lys Lys Pro Asn
 210 215 220

Lys Gly Glu Ser Lys Glu Ala Ile Pro Asp Ser Lys Ser Leu Glu Ser
 225 230 235 240

Ser Lys Glu Ile Pro Glu Gln Arg Glu Asn Lys Gln Gln Gln Lys Lys
 245 250 255

Arg Lys Val Gln Asp Lys Gln Lys Ser Val Ser Val Ser Thr Val His
 260 265 270

<210> 28

<211> 224

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

ES 2 437 337 T3

Met Arg Ala Pro Leu Cys Leu Leu Leu Leu Val Ala His Ala Val Asp
1 5 10 15

Met Leu Ala Leu Asn Arg Arg Lys Lys Gln Val Gly Thr Gly Leu Gly
20 25 30

Gly Asn Cys Thr Gly Cys Ile Ile Cys Ser Glu Glu Asn Gly Cys Ser
35 40 45

Thr Cys Gln Gln Arg Leu Phe Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gly Ile Arg
50 55 60

Gln Tyr Gly Lys Cys Leu His Asp Cys Pro Pro Gly Tyr Phe Gly Ile
65 70 75 80

Arg Gly Gln Glu Val Asn Arg Cys Lys Lys Cys Gly Ala Thr Cys Glu
85 90 95

Ser Cys Phe Ser Gln Asp Phe Cys Ile Arg Cys Lys Arg Gln Phe Tyr
100 105 110

Leu Tyr Lys Gly Lys Cys Leu Pro Thr Cys Pro Pro Gly Thr Leu Ala
115 120 125

His Gln Asn Thr Arg Glu Cys Gln Gly Glu Cys Glu Leu Gly Pro Trp
130 135 140

Gly Gly Trp Ser Pro Cys Thr His Asn Gly Lys Thr Cys Gly Ser Ala
145 150 155 160

Trp Gly Leu Glu Ser Arg Val Arg Glu Ala Gly Arg Ala Gly His Glu
165 170 175

Glu Ala Ala Thr Cys Gln Val Leu Ser Glu Ser Arg Lys Cys Pro Ile
180 185 190

Gln Arg Pro Cys Pro Gly Glu Arg Ser Pro Gly Gln Lys Lys Gly Arg
195 200 205

Lys Asp Arg Arg Pro Arg Lys Asp Arg Lys Leu Asp Arg Arg Leu Asp
210 215 220

<210> 29

5 <211> 262

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Met Arg Leu Gly Leu Cys Val Val Ala Leu Val Leu Ser Trp Thr His
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile
 20 25 30
 Ser Ala Glu Gly Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser
 35 40 45
 Glu Val Asn Gly Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu
 50 55 60
 Glu Arg Asn Asp Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro
 65 70 75 80
 Pro Gly Tyr Phe Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Cys
 85 90 95
 Lys Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr Lys
 100 105 110
 Cys Lys Glu Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys
 115 120 125
 Pro Glu Gly Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser Pro
 130 135 140
 Ala Gln Cys Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser Lys
 145 150 155 160
 Lys Gln Gln Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg Thr Arg
 165 170 175

5

10

Arg Val Leu His Ala Pro Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser Asp Thr
 180 185 190

Lys Glu Thr Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg Val Pro Cys Pro Glu Gly
 195 200 205

Gln Lys Arg Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg Arg Glu Asn Ala Asn Arg
 210 215 220

Asn Leu Ala Arg Lys Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ala Gly Ser Arg Arg
 225 230 235 240

Arg Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Thr Val Gly Pro Leu
 245 250 255

Thr Ser Ala Gly Pro Ala
 260

<210> 30

<211> 243

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Met Gln Phe Arg Leu Phe Ser Phe Ala Leu Ile Ile Leu Asn Cys Met
 1 5 10 15

Asp Tyr Ser His Cys Gln Gly Asn Arg Trp Arg Arg Ser Lys Arg Ala
 20 25 30

Ser Tyr Val Ser Asn Pro Ile Cys Lys Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys
 35 40 45

Asp Asn Gly Cys Ser Arg Cys Gln Gln Lys Leu Phe Phe Phe Leu Arg
 50 55 60

Arg Glu Gly Met Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser
 65 70 75 80

Gly Tyr Tyr Gly His Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys
 85 90 95

Arg Ile Glu Asn Cys Asp Ser Cys Phe Ser Lys Asp Phe Cys Thr Lys
 100 105 110

Cys Lys Val Gly Phe Tyr Leu His Arg Gly Arg Ser Phe Asp Glu Cys
 115 120 125

Pro Asp Gly Phe Ala Pro Leu Glu Glu Thr Met Glu Cys Val Glu Gly
 130 135 140

Cys Glu Val Gly His Trp Ser Glu Trp Gly Thr Cys Ser Arg Asn Asn
 145 150 155 160

Arg Thr Cys Gly Phe Lys Trp Gly Leu Glu Thr Arg Thr Arg Gln Ile
 165 170 175

Val Lys Lys Pro Val Lys Asp Thr Ile Pro Cys Pro Thr Ile Ala Glu
 180 185 190

Ser Arg Arg Cys Lys Met Thr Met Arg His Cys Pro Gly Gly Lys Arg
 195 200 205

Thr Pro Lys Ala Lys Glu Lys Arg Asn Lys Lys Lys Lys Arg Lys Leu
 210 215 220

Ile Glu Arg Ala Gln Glu Gly His Ser Val Phe Leu Ala Thr Asp Arg
 225 230 235 240

Ala Asn Gln

ES 2 437 337 T3

<210> 31
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 31

Met His Leu Arg Leu Ile Ser Trp Leu Phe Ile Ile Leu Asn Phe Met
 1 5 10 15
 Glu Tyr Ile Gly Ser Gln Asn Ala Ser Arg Gly Arg Arg Gln Arg Arg
 20 25 30
 Met His Pro Asn Val Ser Gln Gly Cys Gln Gly Gly Cys Ala Thr Cys
 35 40 45
 Ser Asp Tyr Asn Gly Cys Leu Ser Cys Lys Pro Arg Leu Phe Phe Ala
 50 55 60
 Leu Glu Arg Ile Gly Met Lys Gln Ile Gly Val Cys Leu Ser Ser Cys
 65 70 75 80
 Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly Thr Arg Tyr Pro Asp Ile Asn Lys Cys Thr
 85 90 95
 Lys Cys Lys Ala Asp Cys Asp Thr Cys Phe Asn Lys Asn Phe Cys Thr
 100 105 110
 Lys Cys Lys Ser Gly Phe Tyr Leu His Leu Gly Lys Cys Leu Asp Asn
 115 120 125

Cys Pro Glu Gly Leu Glu Ala Asn Asn His Thr Met Glu Cys Val Ser
 130 135 140
 Ile Val His Cys Glu Val Ser Glu Trp Asn Pro Trp Ser Pro Cys Thr
 145 150 155 160
 Lys Lys Gly Lys Thr Cys Gly Phe Lys Arg Gly Thr Glu Thr Arg Val
 165 170 175
 Arg Glu Ile Ile Gln His Pro Ser Ala Lys Gly Asn Leu Cys Pro Pro
 180 185 190
 Thr Asn Glu Thr Arg Lys Cys Thr Val Gln Arg Lys Lys Cys Gln Lys
 195 200 205
 Gly Glu Arg Gly Lys Lys Gly Arg Glu Arg Lys Arg Lys Lys Pro Asn
 210 215 220
 Lys Gly Glu Ser Lys Glu Ala Ile Pro Asp Ser Lys Ser Leu Glu Ser
 225 230 235 240
 Ser Lys Glu Ile Pro Glu Gln Arg Glu Asn Lys Gln Gln Gln Lys Lys
 245 250 255
 Arg Lys Val Gln Asp Lys Gln Lys Ser Val Ser Val Ser Thr Val His
 260 265 270

<210> 32

<211> 224

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

ES 2 437 337 T3

Met Arg Ala Pro Leu Cys Leu Leu Leu Leu Val Ala His Ala Val Asp
 1 5 10 15

Met Leu Ala Leu Asn Arg Arg Lys Lys Gln Val Gly Thr Gly Leu Gly
 20 25 30

Gly Asn Cys Thr Gly Cys Ile Ile Cys Ser Glu Glu Asn Gly Cys Ser
 35 40 45

Thr Cys Gln Gln Arg Leu Phe Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gly Ile Arg
 50 55 60

Gln Tyr Gly Lys Cys Leu His Asp Cys Pro Pro Gly Tyr Phe Gly Ile
 65 70 75 80

Arg Gly Gln Glu Val Asn Arg Cys Lys Lys Cys Gly Ala Thr Cys Glu
 85 90 95

Ser Cys Phe Ser Gln Asp Phe Cys Ile Arg Cys Lys Arg Gln Phe Tyr

100

105

110

Leu Tyr Lys Gly Lys Cys Leu Pro Thr Cys Pro Pro Gly Thr Leu Ala
 115 120 125

His Gln Asn Thr Arg Glu Cys Gln Gly Glu Cys Glu Leu Gly Pro Trp
 130 135 140

Gly Gly Trp Ser Pro Cys Thr His Asn Gly Lys Thr Cys Gly Ser Ala
 145 150 155 160

Trp Gly Leu Glu Ser Arg Val Arg Glu Ala Gly Arg Ala Gly His Glu
 165 170 175

Glu Ala Ala Thr Cys Gln Val Leu Ser Glu Ser Arg Lys Cys Pro Ile
 180 185 190

Gln Arg Pro Cys Pro Gly Glu Arg Ser Pro Gly Gln Lys Lys Gly Arg
 195 200 205

Lys Asp Arg Arg Pro Arg Lys Asp Arg Lys Leu Asp Arg Arg Leu Asp
 210 215 220

REIVINDICACIONES

- 1.- Uso de una molécula nucleotídica que codifica un polipéptido de Futrina 2 de acuerdo con SEC ID N°: 27 para la preparación de una composición farmacéutica para activación de la cascada de señales Wnt.
- 5 2.- Uso de un ligando que se fija específicamente a un polipéptido de Futrina 2 de acuerdo con SEC ID N°: 27 para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir la cascada de señales Wnt, en donde el ligando es un anticuerpo.
- 10 3.- Uso de un ligando que se fija específicamente a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de Futrina 2 de acuerdo con SEC ID N°: 27 para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir la cascada de señales Wnt, en donde el ligando es una molécula de nucleótido que se fija a un ácido nucleico de Futrina 2 que codifica un polipéptido de Futrina 2 de acuerdo con SEC ID N°: 27.
- 4.- Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el ligando es un anticuerpo monoclonal.
- 5.- Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, de cadena sencilla y/o humanizado.
- 15 6.- Uso de acuerdo con la reivindicación 1 para soportar procesos regenerativos.
- 7.- Uso de acuerdo con la reivindicación 1 para promover el crecimiento de músculo.
- 8.- Uso de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3 para uso en el tratamiento de tumores.
- 9.- Uso de acuerdo con la reivindicación 8, para uso en el tratamiento de tumores de mama, ovario, hígado, cérvix, colon, pulmón, recto, testículos, páncreas, hueso y piel.
- 20 10.- Uso de acuerdo con la reivindicación 1, 2 ó 3, para modular la formación de hueso.
- 11.- Un método para identificar activadores/agonistas o inhibidores/antagonistas de un polipéptido de Futrina 2 de acuerdo con SEC ID N°: 27 o un polipéptido que muestra una identidad de al menos 80% con el mismo, que comprende los pasos de:
- (a) incubar un compuesto candidato con dicho polipéptido;
- 25 (b) ensayar la actividad biológica de Futrina 2 de acuerdo con SEC ID N°: 27 o un polipéptido que muestra una identidad de al menos 80% con el mismo, en un ensayo de informadores de luciferasa inducibles por Wnt en células HEK 293 transfectadas, y
- (c) determinar si se ha alterado la actividad biológica de dicho polipéptido.
- 30 12. Un método para identificar y obtener un fármaco candidato para la terapia de una enfermedad asociada con actividades aberrantes de Futrina 2 de acuerdo con SEC ID N°: 27 o un polipéptido que muestra una identidad de al menos 80% con el mismo, que comprende los pasos de:
- (a) poner en contacto un polipéptido de Futrina 2 de acuerdo con SEC ID N°: 27 o un polipéptido que muestra una identidad de al menos 80% con el mismo o una célula que expresa dicho polipéptido, y opcionalmente el o los ligandos correspondientes, en presencia de componentes capaces de proporcionar una señal detectable en respuesta a la fijación a dicho fármaco candidato a cribar; y
- 35 (b) detectar la presencia o ausencia de una señal o el aumento de la señal generada, en donde la presencia o aumento de la señal es indicativa de un fármaco supuesto.
- en donde la actividad de Futrina 2 de acuerdo con SEC ID N° 27 o un polipéptido que muestra una identidad de al menos 80% con el mismo es analizado por un ensayo de informadores de luciferasa indubles por Wnt en células HEK 293 transfectadas.
- 40 13.- El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el fármaco candidato es un solo compuesto o una pluralidad de compuestos.
- 14.- El método de acuerdo con las reivindicaciones 12-13, en el que el compuesto se sintetiza químicamente, se produce por microbiología y/o está comprendido en extractos de células
- 45 15.- El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que los activadores/agonistas o inhibidores/antagonistas se seleccionan de anticuerpos, oligonucleótidos, proteínas o moléculas pequeñas.
- 16.- El método de acuerdo con las reivindicaciones 12-14, en el que la enfermedad es un tumor o una enfermedad

de los riñones, músculos, huesos y ojos.

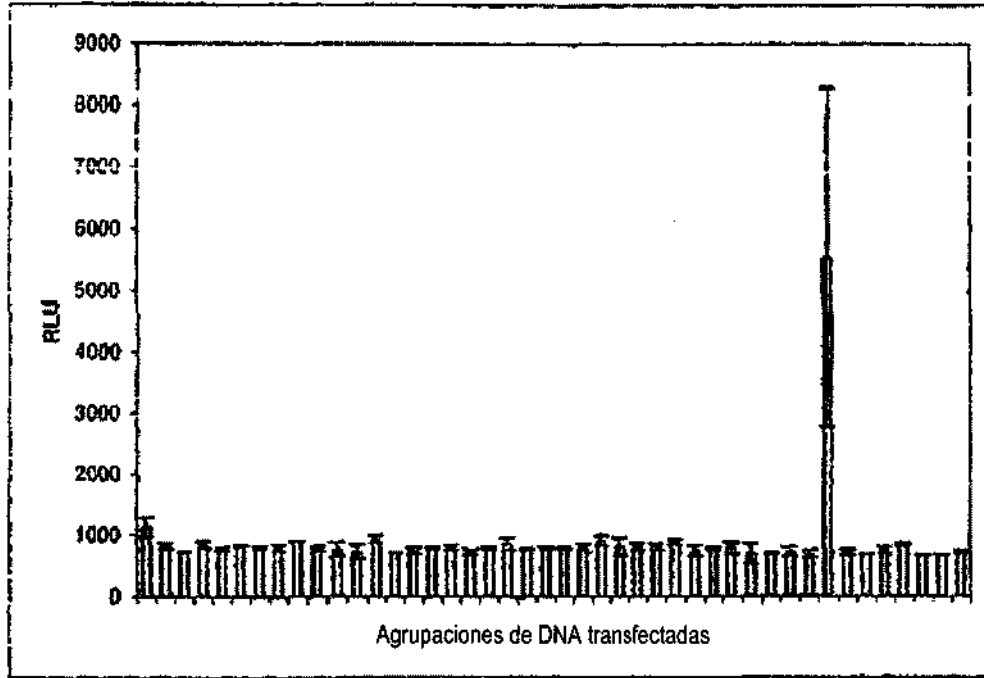


Figura 1

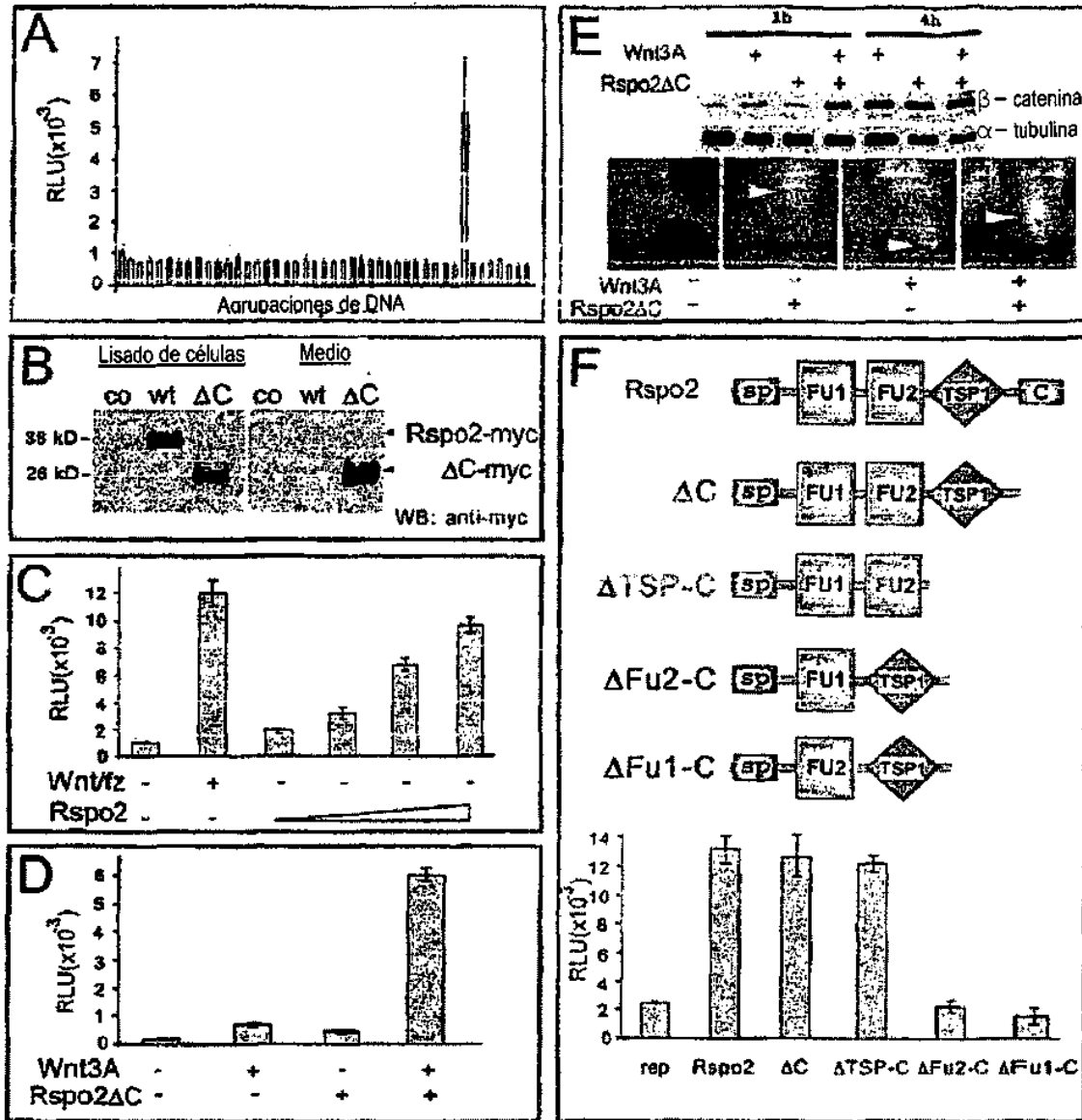


Figura 2

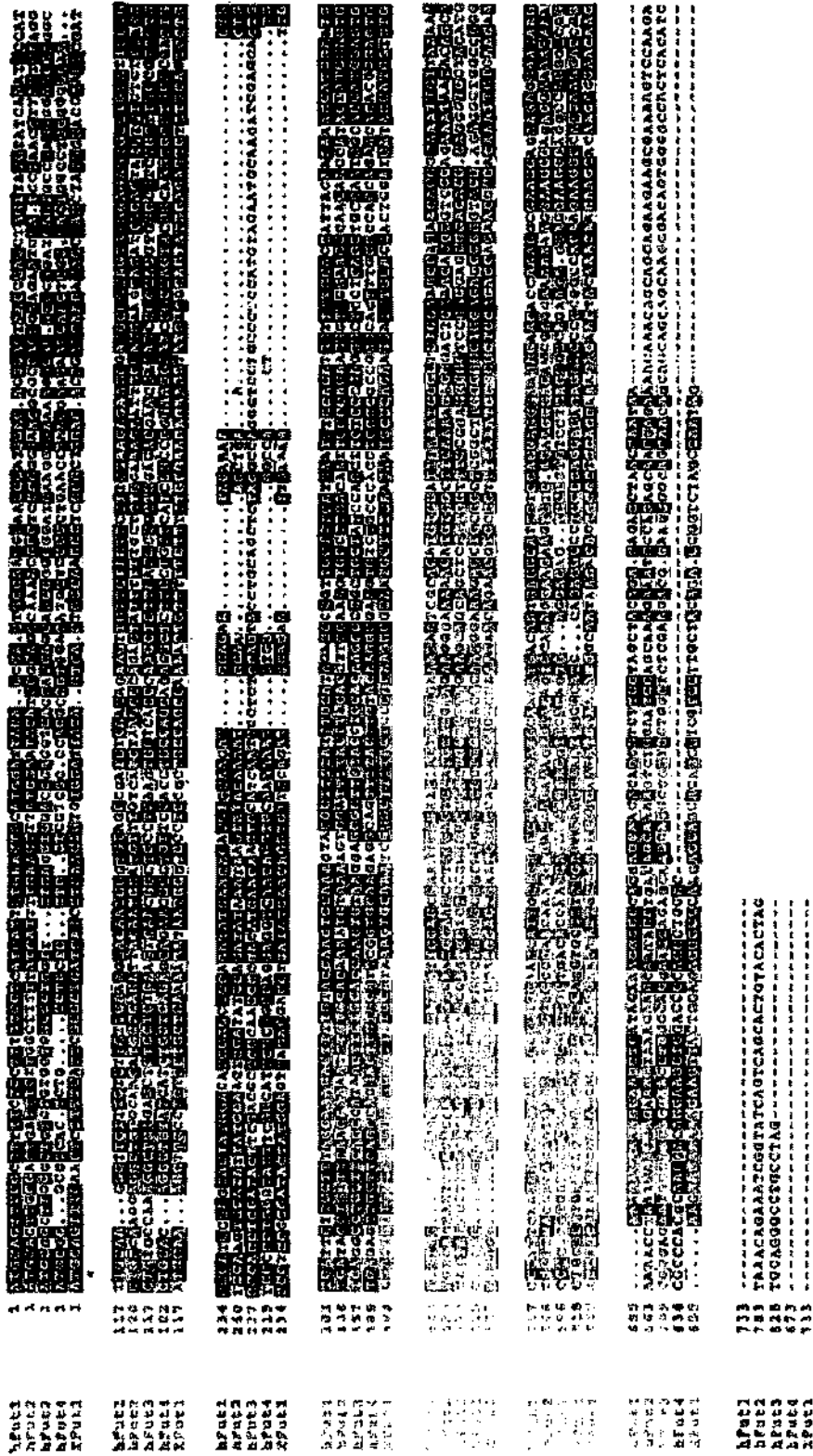


Figura 3

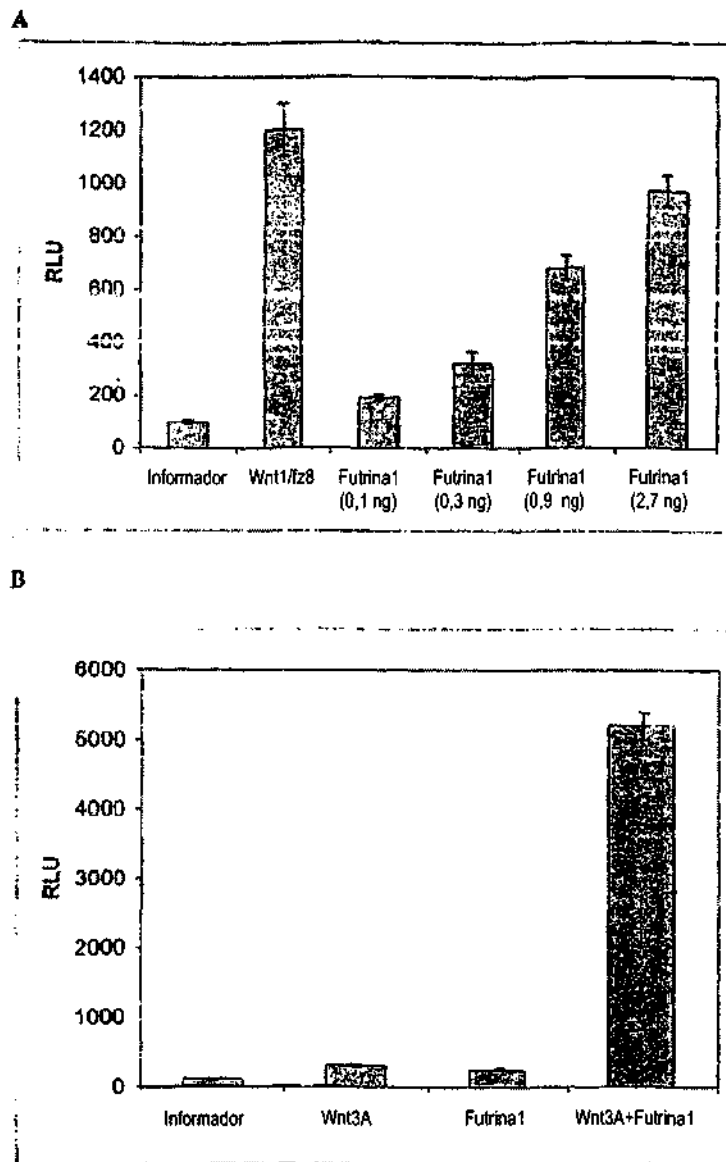
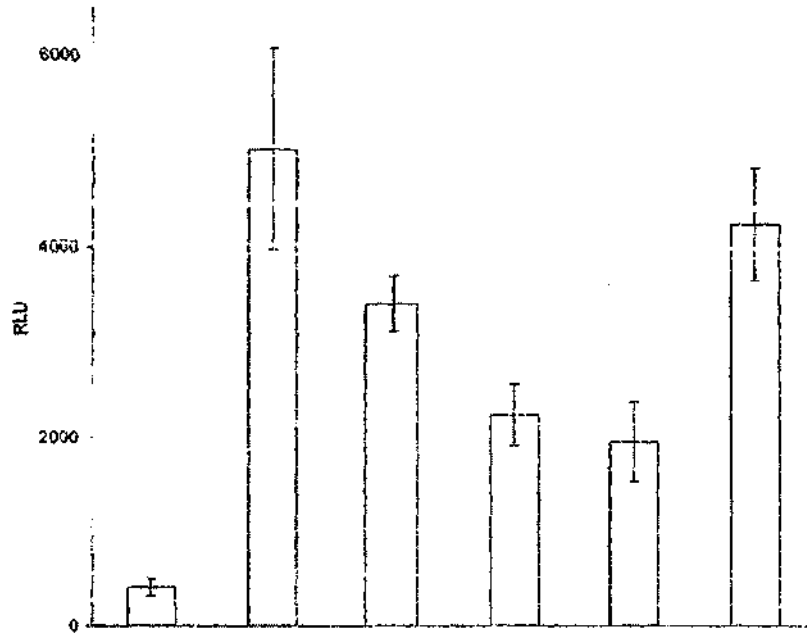


Figura 5



pSuper Non.	+	+				
pSuper hFut1			+		+	+
pSuper hFut2				+	+	+
Wnt3A med.	-	+	+	+	+	+
mFut1						+

Figura 7

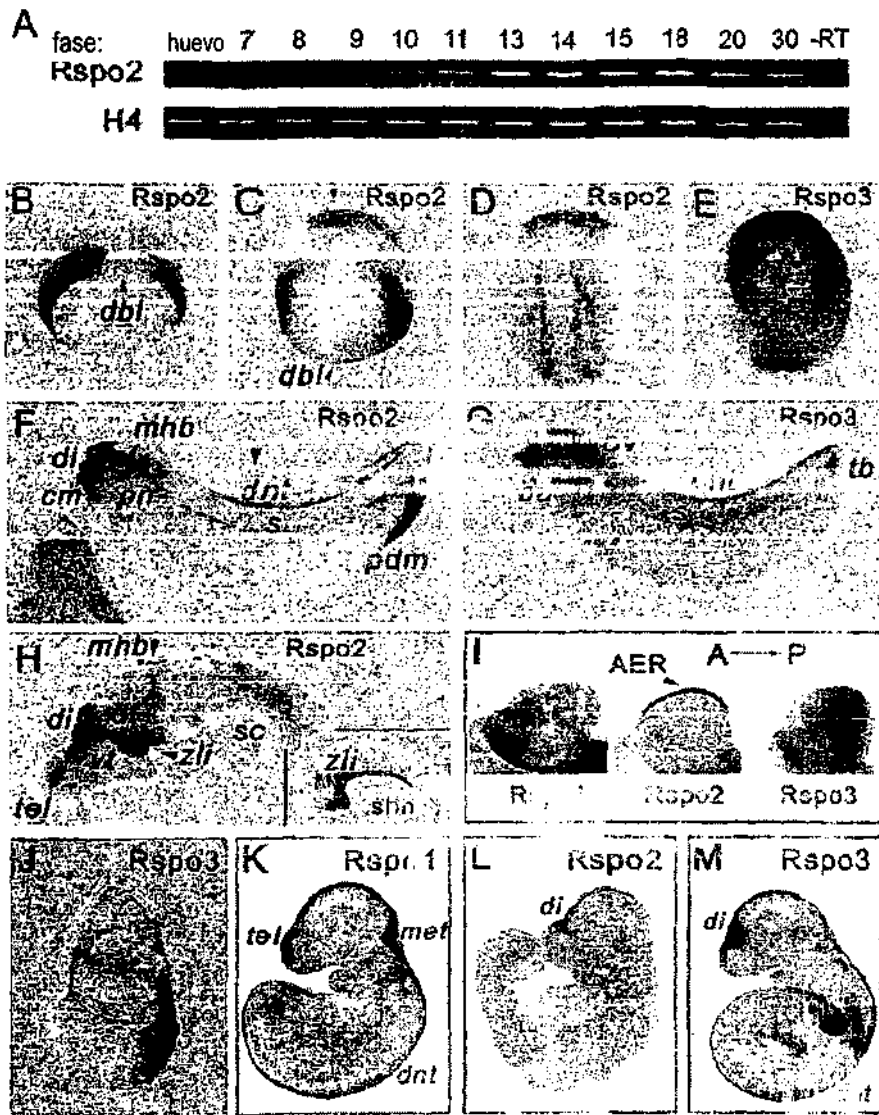


Figura 8

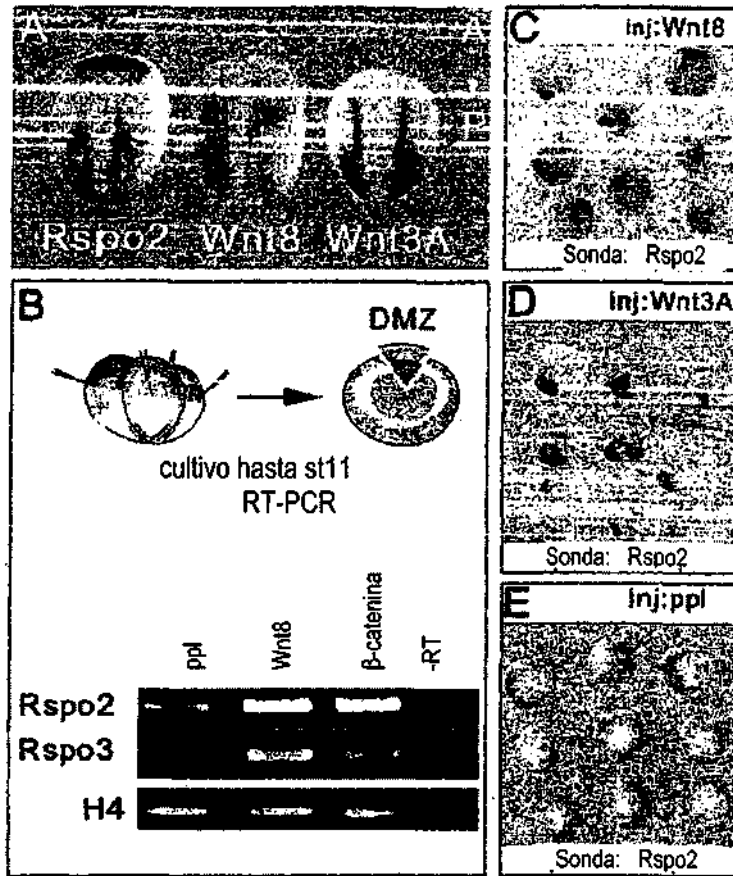


Figura 9

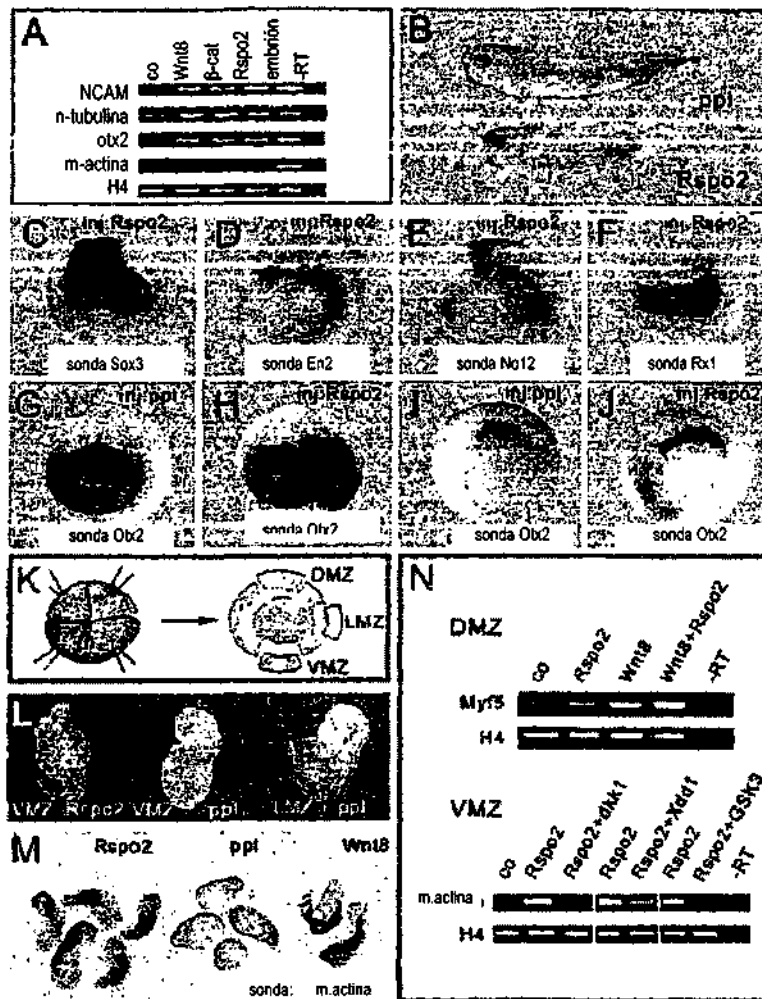


Figura 11

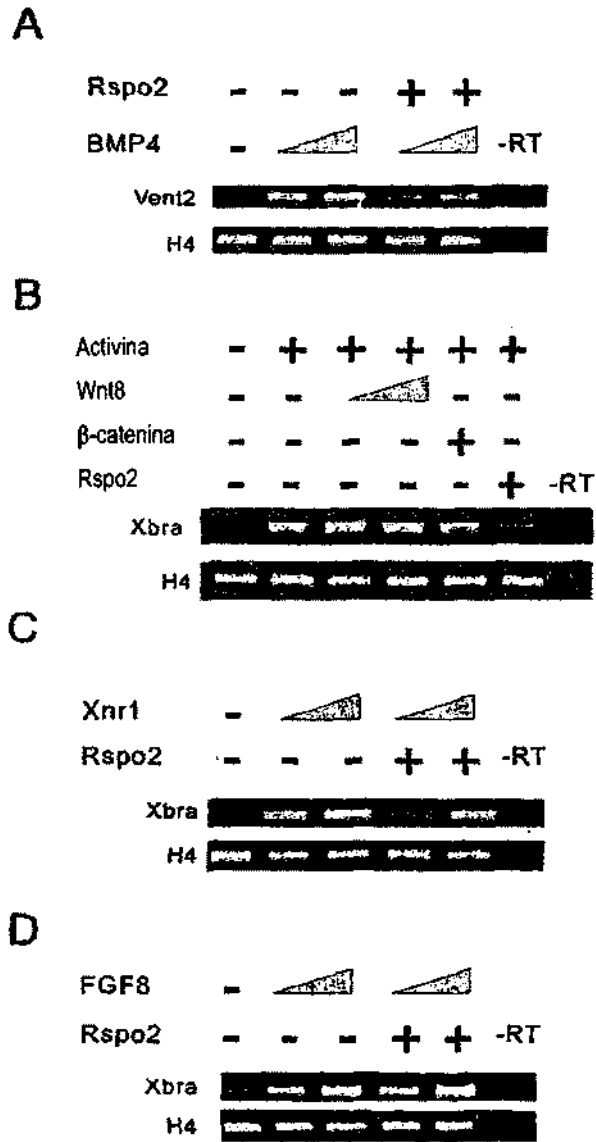


Figura 12

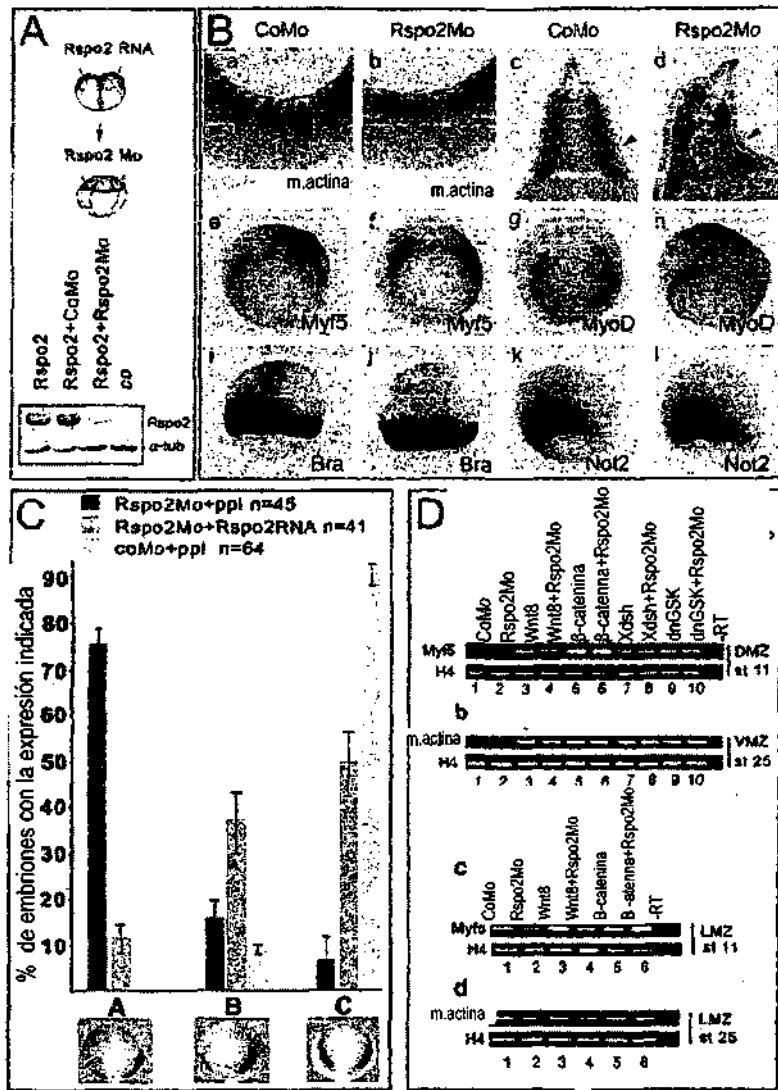


Figura 13

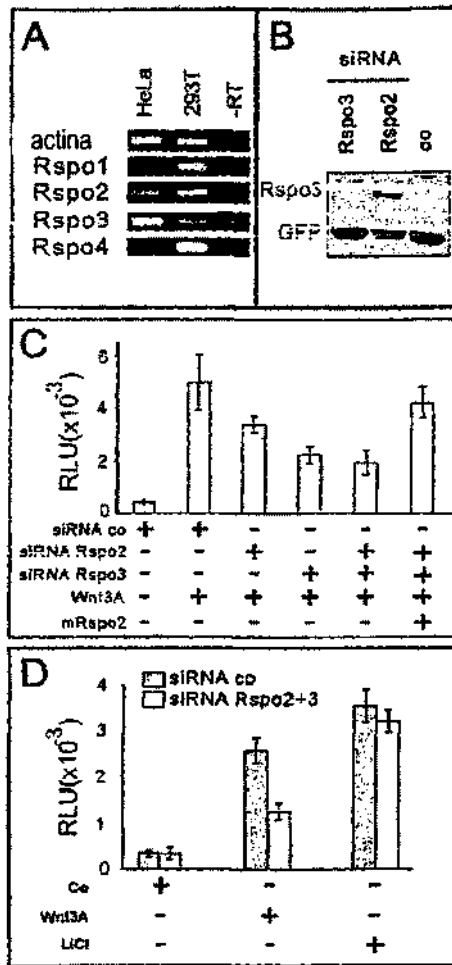


Figura 14

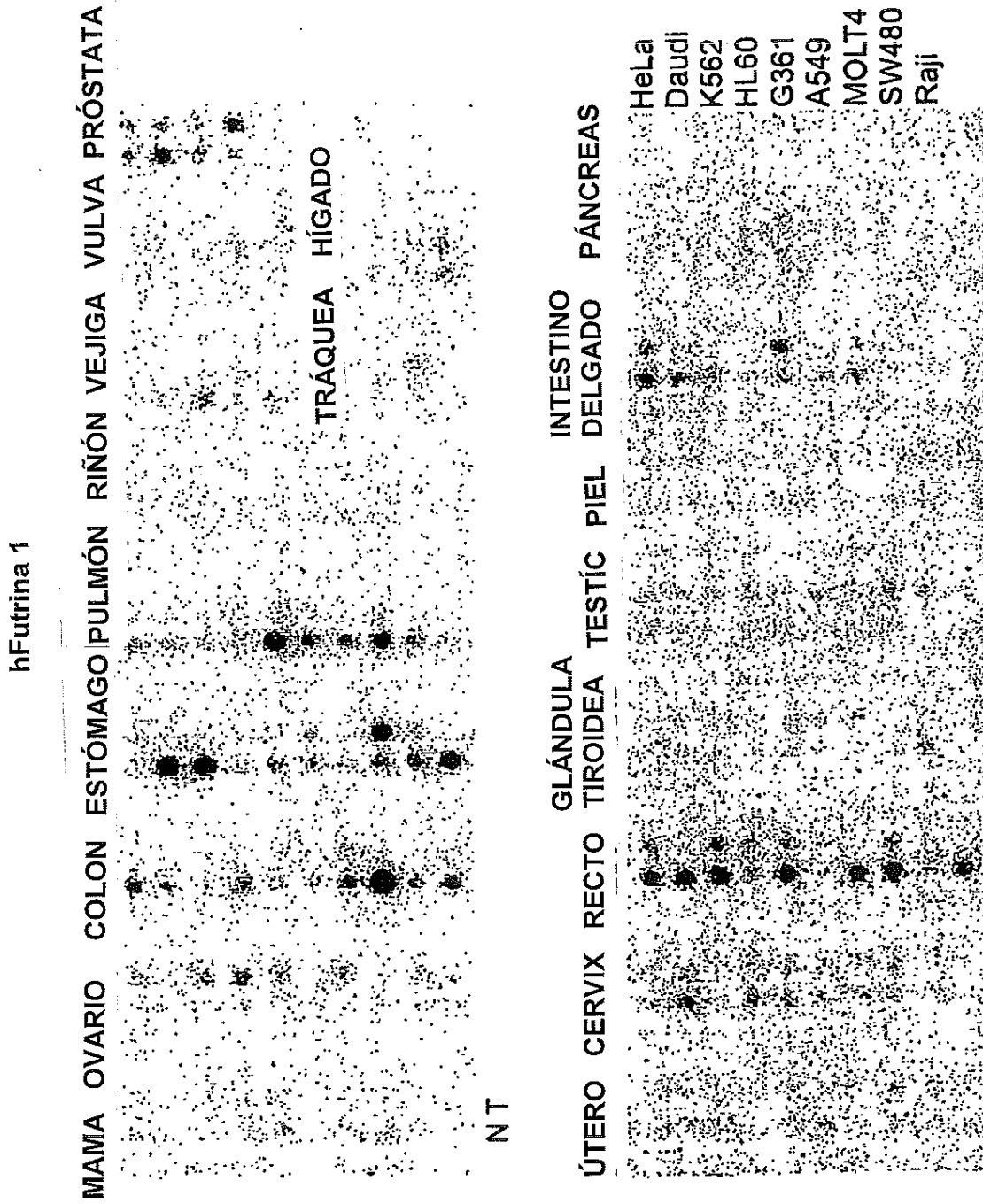


Figura 15

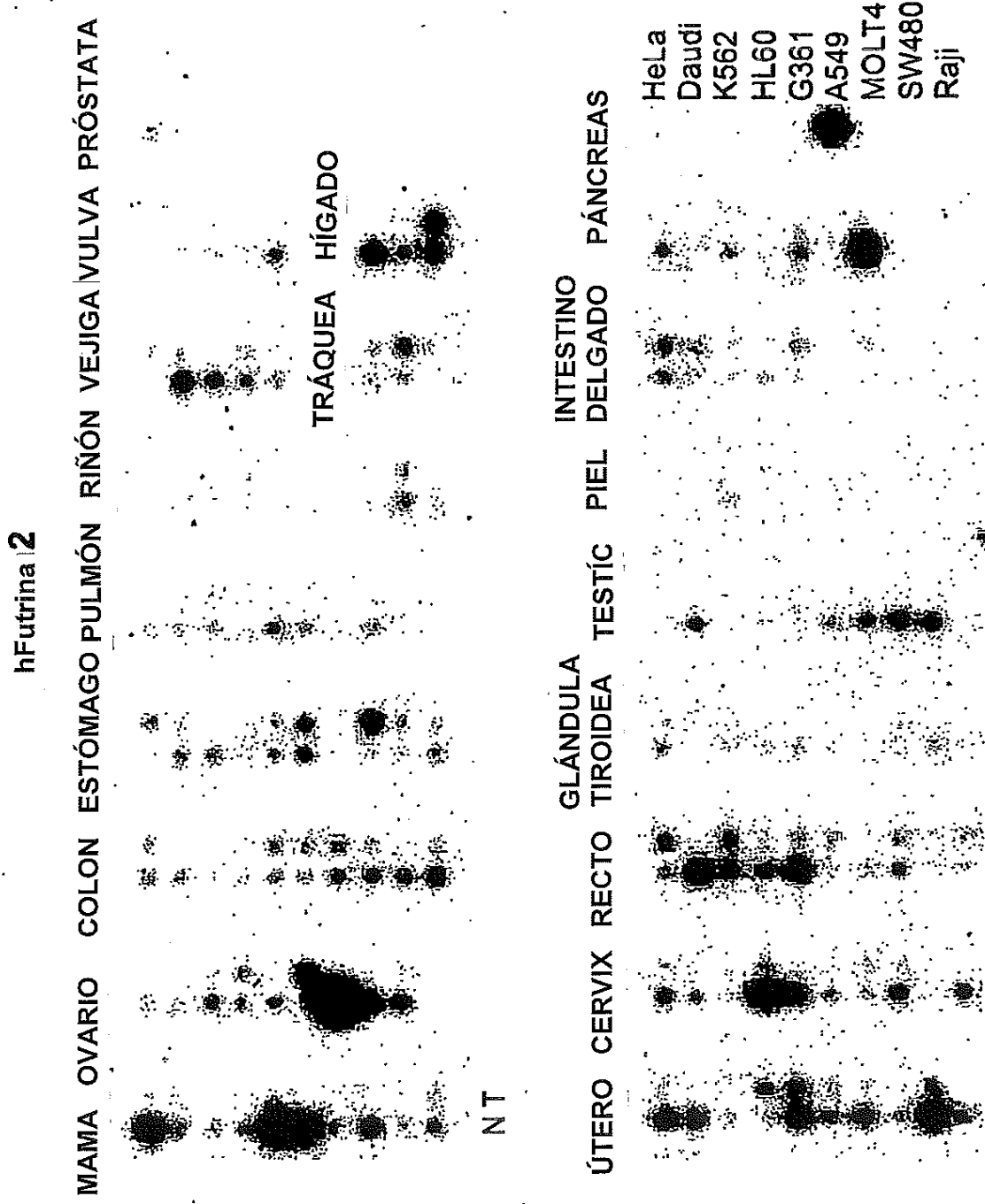


Figura 15 (continúa)

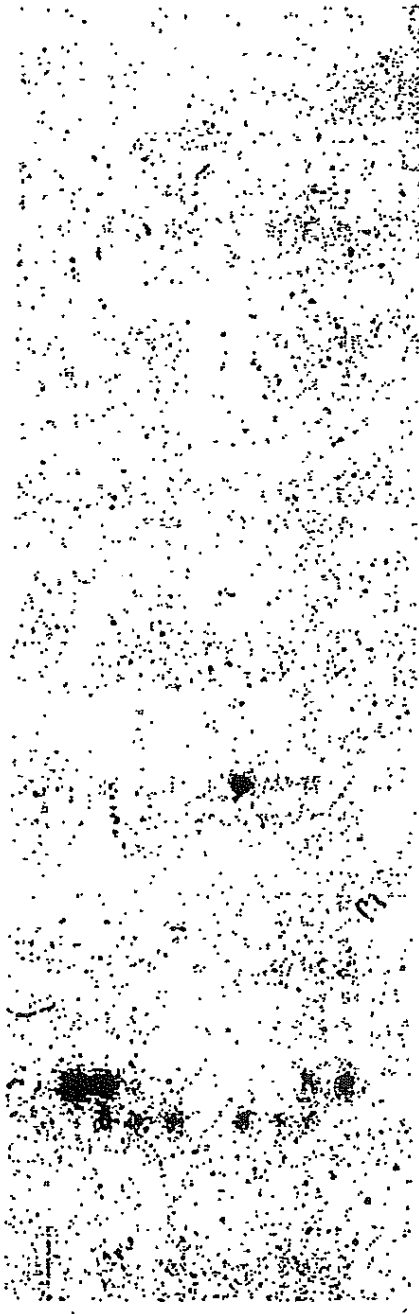
Hfutrina4

OVARIO



Hfutrina3

MAMA OVARIO COLON ESTÓMAGO PULMÓN RIÑÓN VEJIGA VULVA PRÓSTATA



GLÁNDULA INTestino
ÚTERO CERVIX RECTO TIROIDEA TESTÍC PIEL DELGADO PÁNCREAS

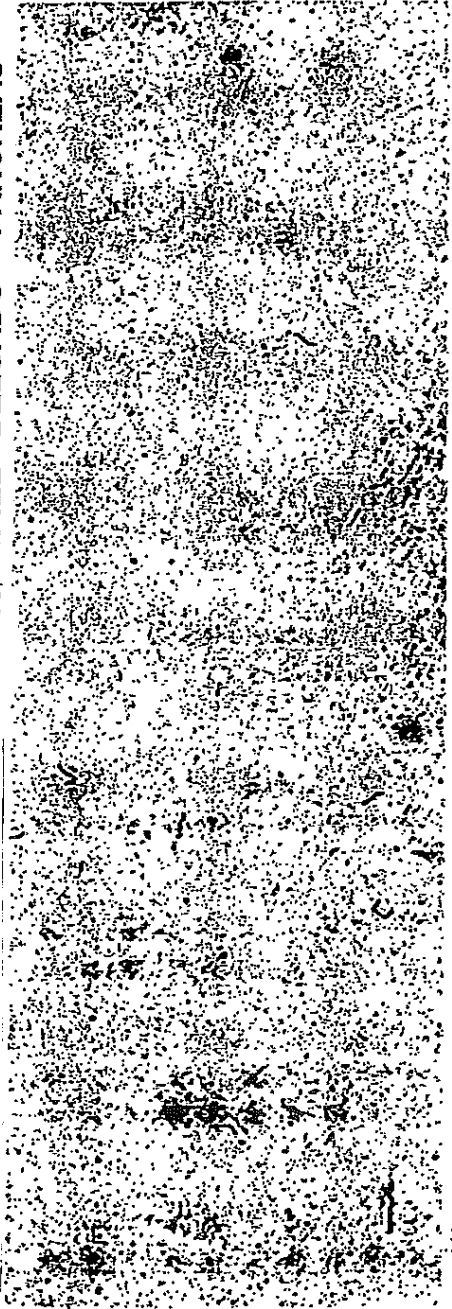


Figura 15 (continúa)

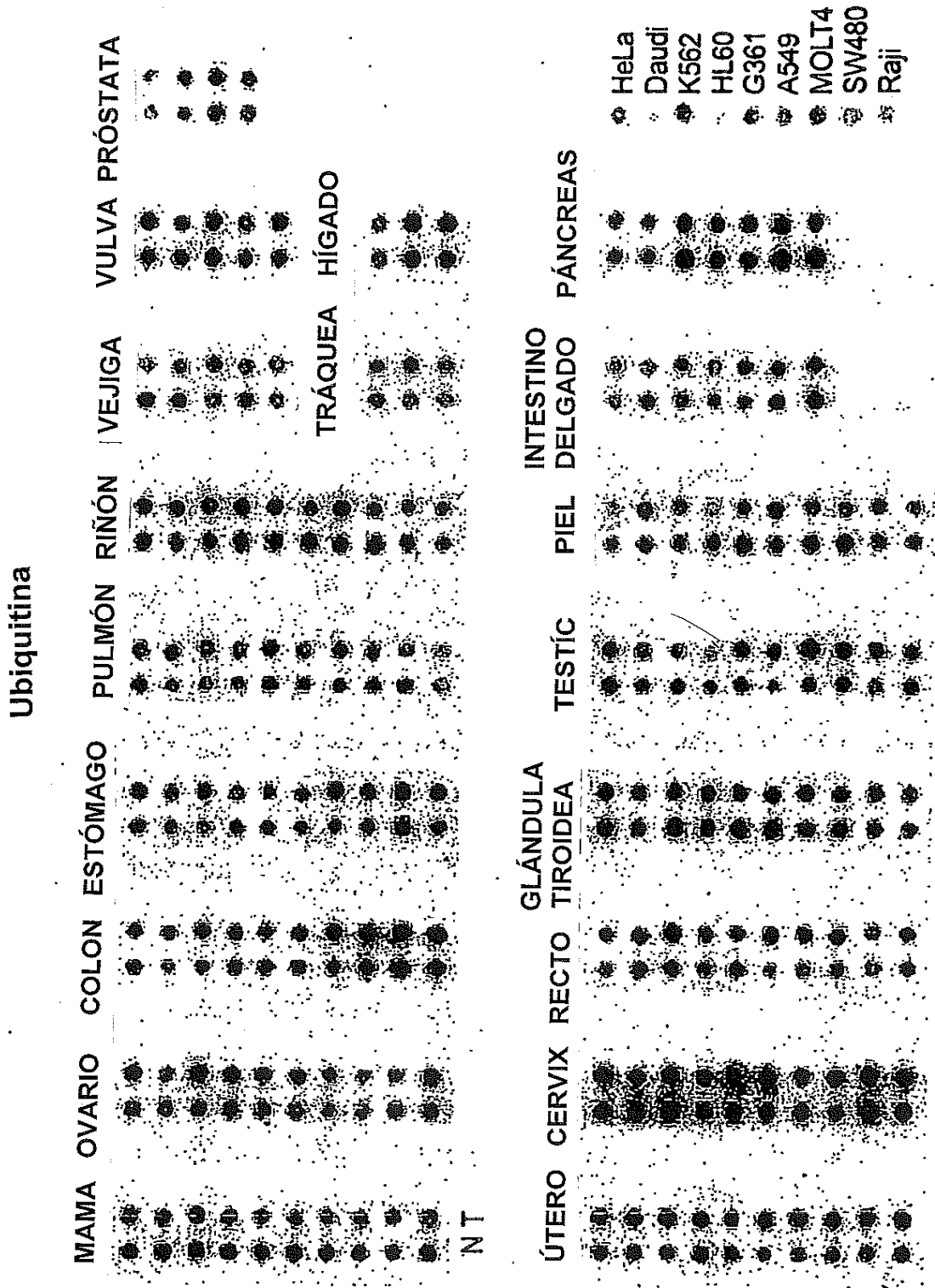


Figura 15 (continúa)

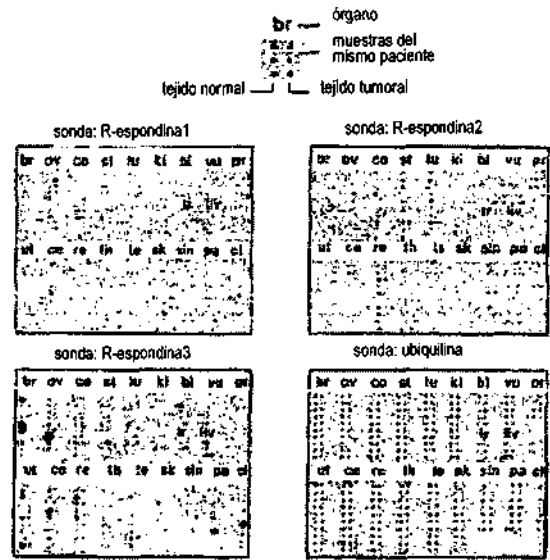


Figura 16

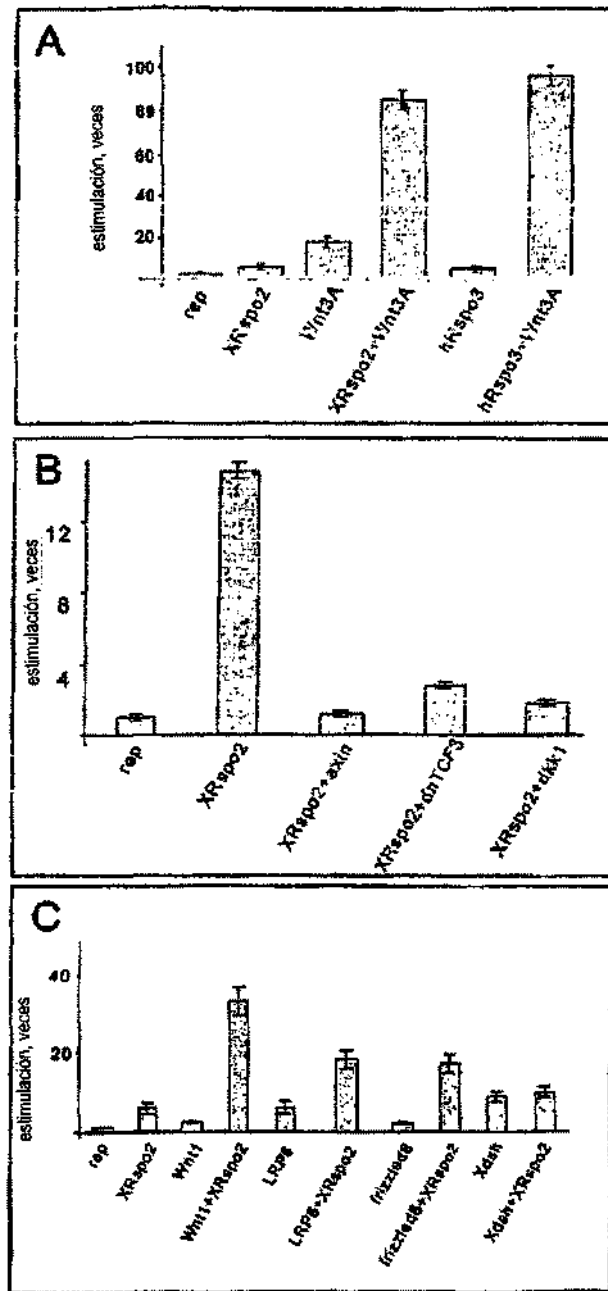


Figura 17